

**DOTTORATO DI RICERCA IN
ETOLOGIA ED ECOLOGIA ANIMALE
(XXII CICLO)**

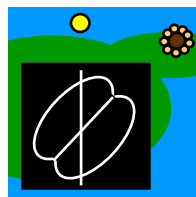
***Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda)
bioindicatore della contaminazione da
metalli in traccia dei litorali sabbiosi:
bioaccumulo e biomarkers**

Tesi di

Giuseppe Ungherese

**Coordinatore Prof. Alberto Ugolini
Tutor Prof. Alberto Ugolini**

(2009)



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA “L.
Pardi”

**DOTTORATO DI RICERCA IN ETOLOGIA
ED ECOLOGIA ANIMALE
(XXII CICLO, BIO 05, BIO 07)**

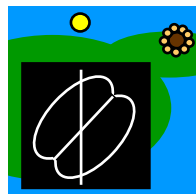
***Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda)
bioindicatore della contaminazione da
metalli in traccia dei litorali sabbiosi:
bioaccumulo e biomarkers**

Tesi di

Giuseppe Ungherese

Coordinatore Prof. Alberto Ugolini

(2009)



INDICE

CAPITOLO

1. Introduzione	pag. 7
2. Evaluation of trace metals contamination along the Tuscan and Corsican coast (North Mediterranean, Italy) using the supralittoral amphipod <i>Talitrus saltator</i> (Montagu)	31
3. Metallothionein induction in the sandhopper <i>Talitrus saltator</i> (Montagu) (Crustacea, Amphipoda).	49
4. Relationship between heavy metals pollution and genetic diversity in Mediterranean populations of the sandhopper <i>Talitrus saltator</i> (Montagu) (Crustacea, Amphipoda)	63
5. Il comportamento fototattico di <i>Talitrus saltator</i> (Montagu) come biomarker dell'esposizione a Cu, Cd e Zn.	85
6. Sandhopper solar orientation as a behavioural biomarker of trace metals contamination.	101
7. Esposizione a metalli in traccia e attività locomotoria in <i>Talitrus saltator</i> (Montagu) (Crustacea, Amphipoda).	115
8. Seawater Ca^{2+} concentration influences solar orientation in <i>Talitrus saltator</i> (Crustacea, Amphipoda)	145
9. The amphipod <i>Talitrus saltator</i> as a bioindicator of human trampling on sandy beaches.	161
10. Conclusioni generali	181

RIASSUNTO

Il sopralitorale di coste sabbiose, oltre ad essere fortemente esposto agli effetti di numerose attività antropiche (ad esempio frequentazione turistica e costruzione di porti ed altre infrastrutture), è caratterizzato da un notevole input di sostanze inquinanti la cui origine può essere sia marina che terrestre. Tra le sostanze di maggior rilievo vi sono i metalli in traccia i quali costituiscono una seria minaccia per gli ecosistemi naturali a causa della loro persistenza, tossicità, difficile biodegradabilità e tendenza ad accumularsi negli organismi viventi. Nelle aree costiere, contrariamente al sopralitorale di coste sabbiose, numerosi organismi dell'ambiente litorale sommerso e della zona intertidale di coste rocciose e sabbiose sono stati proposti come bioindicatori della contaminazione ambientale. I bioindicatori possono essere utilizzati per stabilire variazioni geografiche e/o temporali della biodisponibilità di contaminanti nell'ambiente marino, fornendo misure integrate nel tempo della quantità di composti inquinanti ecotossicologicamente rilevanti. Nel corso degli ultimi anni, parallelamente all'approccio ecotossicologico classico (basato sulla misura dei contaminanti nei tessuti degli organismi bioindicatori) si è sviluppato un nuovo metodo basato sulla valutazione di tutte quelle risposte, misurabili a differenti livelli di organizzazione biologica, che forniscono indicazioni riguardanti l'esposizione e/o l'effetto di uno più composti inquinanti: i biomarkers.

Gli obiettivi della mia tesi sono quelli di valutare il possibile utilizzo di *Talitrus saltator* come bioindicatore degli effetti della frequentazione turistica e della contaminazione da metalli in traccia del sopralitorale di coste sabbiose. Per quel che riguarda la contaminazione da metalli in traccia ho utilizzato un approccio ecotossicologico basato sia sul bioaccumulo che sui biomarkers.

I risultati indicano il valido utilizzo di *T. saltator* per identificare aree caratterizzate da un diverso grado di contaminazione ambientale da metalli in traccia anche su scala geografica ridotta. Inoltre, i risultati ottenuti mediante l'impiego di alcuni biomarkers (variabilità genetica, metallotioneine e risposte comportamentali) ne hanno evidenziato la valida applicabilità in *T. saltator*. In particolar modo, i risultati riguardanti l'utilizzo di diverse risposte comportamentali (fototassia, orientamento solare, attività locomotoria) hanno fornito risultati particolarmente promettenti. Inoltre, l'assenza o una diminuzione della concentrazione di Ca^{2+} nel medium acquoso influenza negativamente la corretta scelta direzionale da parte dei talitri. *T. saltator* risulta essere particolarmente sensibile anche agli effetti della frequentazione turistica del sopralitorale ed, in modo particolare, degli effetti dell'human trampling.

In conclusione, *T. saltator* si presenta come un valido bioindicatore del sopralitorale di coste sabbiose e potrebbe essere utilmente utilizzato per monitorare sia gli effetti della frequentazione turistica dei litorali sia il grado di contaminazione da metalli in traccia (mediante il bioaccumulo e biomarkers), nell'ottica di una gestione eco-compatibile degli ecosistemi sabbiosi.

CAPITOLO 1

Introduzione

1. LE COSTE SABBIOSE: IMPATTO ANTROPICO E CARATTERISTICHE ECOLOGICHE

L'eccessivo sfruttamento delle risorse naturali e la crescente distruzione degli habitat naturali, dovuto principalmente all'aumento vertiginoso della popolazione umana, hanno generato un enorme impatto sugli ecosistemi in tutto il mondo. Negli ambienti costieri, costituiti principalmente dalla presenza di spiagge sabbiose, tale impatto è stato particolarmente rilevante soprattutto a causa di uno spostamento, sempre crescente, della popolazione umana verso le coste. Attualmente, infatti, più della metà della popolazione umana vive lungo gli ambienti costieri (nelle aree comprese tra 0 e 60 km di distanza dalle coste) e stime dell'ONU indicano come questa percentuale potrebbe raggiungere proporzioni ancora più rilevanti (tre quarti della popolazione umana) entro il 2020 (UNCED, 1992). Ad esempio, per quel che riguarda il bacino del Mediterraneo, la popolazione degli stati costieri era di 246 milioni nel 1960, di 380 milioni nel 1990 e di 450 milioni nel 1999 (EEA, 1999). Nonostante le aree costiere siano state da sempre sfruttate dall'uomo essendo importanti centri di sviluppo per potenziale scambio di merci e disponibilità di risorse alimentari e materiali, i cambiamenti indotti dalle attività umane hanno subito un forte incremento nel corso del XXI secolo (Halpern et al., 2008; Nordstrom, 2008).

Tra le maggiori fonti di stress è opportuno sottolineare (Schlacher et al., 2007; Defeo et al., 2009):

- la costruzione di infrastrutture (aree portuali, strade, ferrovie, edifici, etc.) con conseguente perdita e frammentazione degli habitat
- l'erosione costiera
- gli interventi gestionali come i ripascimenti e la costruzione di pannelli frangiflutti realizzati per garantire la stabilizzazione e la difesa delle spiagge dall'erosione
- lo sfruttamento delle risorse naturali (pesca, attività estrattive)
- le attività di tipo ricreativo principalmente a scopo turistico - balneare con conseguente incremento dell'afflusso umano e di tutte quelle attività connesse all'utilizzazione di tipo turistico (pulizia meccanica della spiaggia, calpestio, transito di veicoli fuoristrada)
- l'inquinamento ambientale costituito da composti di origine naturale e antropogenica che raggiungono le coste tramite scarichi urbani, agricoli e industriali, apporto di fiumi, fuoriuscite di petrolio dalle navi, etc.)
- l'inquinamento luminoso
- i cambiamenti climatici (innalzamento del livello del mare con conseguente modificazione dell'altezza della linea di riva)

L'influenza negativa delle attività umane sugli ambienti costieri può essere sia di tipo diretto (frequentazione turistica) che indiretto (cambiamenti climatici, immissione di sostanze inquinanti).

A differenza di altri ecosistemi, le spiagge sabbiose hanno ricevuto scarsa attenzione da parte dei ricercatori poiché, il loro intrinseco, e poco apprezzato, valore ecologico è stato percepito come secondario rispetto al loro valore economico (Brown e McLachlan, 2006; Schlacher et al., 2007).

Le spiagge sabbiose, classificate in base alle caratteristiche della sabbia, del regime tidale e del moto ondoso, sono ambienti estremamente dinamici a causa di diversi fattori (ad esempio movimento incessante dell'acqua, del vento e della sabbia). Oltre a rappresentare importanti aree di transizione e collegamento tra due tipi di ecosistemi molto diversi tra loro (quello marino e quello terrestre), le spiagge sabbiose forniscono un ampio range di servizi ecosistemici necessari per garantire l'utilizzazione umana delle coste (Schlacher et al., 2007; Defeo et al., 2009). Alcuni dei più importanti servizi includono: deposito e trasporto dei sedimenti, dissipazione dell'energia del moto ondoso, protezione contro eventi estremi (tempeste, mareggiate), filtrazione e purificazione dell'acqua, riciclo e mineralizzazione dei nutrienti, immagazzinamento di materiale organico e di composti inquinanti ed inoltre ospitano organismi utilizzati come fonte di cibo dall'uomo (Schlacher et al., 2007; Defeo et al., 2009). Le aree costiere sono molto importanti dal punto di vista biologico dato che costituiscono delle aree di nursery per numerose specie di pesci, siti di nidificazione per numerose specie di uccelli e tartarughe marine e ospitano numerosi organismi predati da uccelli ed organismi terrestri (Schlacher et al., 2007; Defeo et al., 2009).

Le spiagge sabbiose, pur apparendo habitat poveri di forme di vita, sono invece caratterizzate da un'elevata biodiversità in quanto ospitano diverse popolazioni di organismi mesopsammici come diatomee, protozoi, batteri e microalghe, i quali formano una differente rete trofica (Brown e McLachlan, 2006). Gli invertebrati di maggiori dimensioni, appartenenti al macrobenthos, sono rappresentativi di diversi phyla (molluschi, crostacei, anellidi) e costituiscono la maggiore componente in termini di abbondanza e biomassa (Brown e McLachlan, 2006).

La forte variabilità, sia giornaliera che stagionale, dei parametri fisici delle spiagge sabbiose quali temperatura, salinità e umidità rendono difficile la sopravvivenza degli organismi che vi risiedono. Per questo motivo, molte delle specie tipiche di questi ambienti presentano peculiari adattamenti morfologici ed eco-fisiologici come la mobilità, comportamento ritmico, abilità nello scavo, esoscheletro protettivo, comportamento ritmico (circadiano, tidale, lunare, stagionale), raffinati meccanismi di orientamento e plasticità comportamentale (Chelazzi e Vannini, 1988; Brown e McLachlan, 2006).

Gli anfipodi talitridi sono organismi tipici del sopralitorale di coste sabbiose e, oltre a rappresentare una delle maggiori componenti in termini di biomassa, svolgono un ruolo chiave dal punto di vista del flusso dell'energia

che passa attraverso l'ecosistema (Fig. 1). Detritivori, spazzini e grattatori, i talitri si nutrono di materiale organico, di origine sia marina che terrestre, e costituiscono un'importante fonte di cibo per numerose specie di invertebrati, pesci, uccelli ed anche mammiferi (Palluault, 1954; Griffiths et al., 1983; Wildish, 1988; Bergerard, 1989) (Fig. 1).

Inoltre, i talitri hanno messo a punto un meccanismo di orientamento zonale che permette loro di rimanere nell'area specifica compatibile con le loro esigenze vitali (la zona umida della battigia) o di tornarvi ogni volta che se ne allontanano (per una revisione si veda Pardi e Ercolini, 1986) (Fig. 2). I talitri di giorno rimangono infossati nei loro rifugi scavati nel substrato umido per evitare i rischi di disidratazione e di predazione (Geppetti e Tongiorgi, 1967; Rüppel, 1967; Wildish, 1983; Williams, 1995). Al tramonto, o durante il giorno se le condizioni di temperatura e umidità lo permettono, emergono sulla superficie per compiere migrazioni attive, principalmente a scopo alimentare, lungo l'asse mare-terra (asse Y) della spiaggia, perpendicolarmente alla linea di riva (asse X). Gli individui che si allontanano dalla fascia di sabbia umida vi fanno ritorno seguendo la strada ecologicamente più conveniente perpendicolare all'asse X (linea di riva) detta Direzione Teorica di Fuga (DTF) (Pardi e Ercolini, 1986) (Fig. 2).

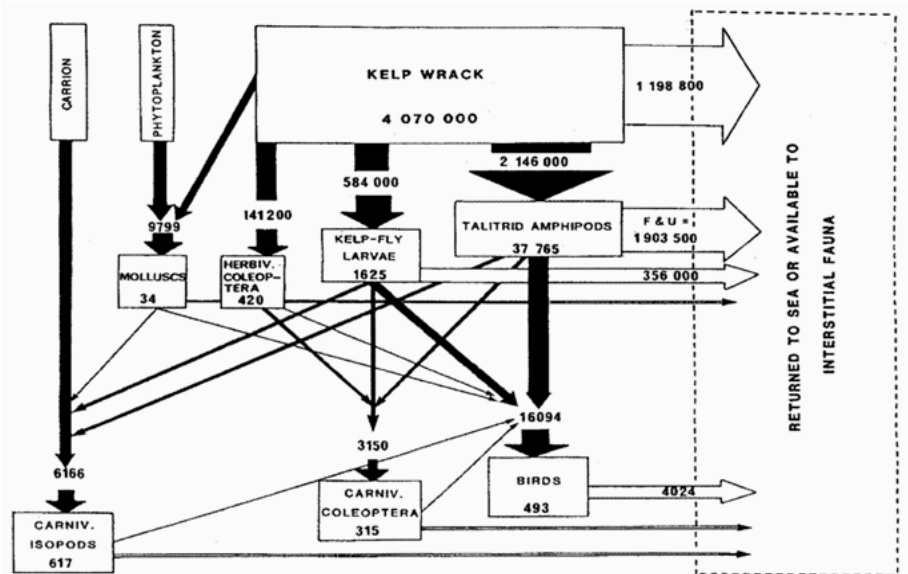


Fig. 1. Diagramma del flusso di energia derivante dal consumo di materiale organico della spiaggia di Kommetjie, Città del Capo (Sud Africa). Le frecce indicano il flusso di energia annuale ($\text{KJ m}^{-1} \text{y}^{-1}$). Da Griffiths et al. 1983, modificato.

Questo permette loro di evitare sia la prolungata presenza in acqua, dove sono soggetti a predazione da parte dei pesci (Ugolini, 1989), sia lontano dalla fascia umida, dove rischiano la disidratazione e la predazione da parte di organismi terrestri (Williamson, 1951; Papi e Pardi, 1953; Pallault, 1954). La scelta della direzione di fuga viene effettuata integrando diversi riferimenti esterni sia universali che locali. I fattori orientanti principali sono quelli universali: campo magnetico terrestre, luce polarizzata, luna e sole (si veda Pardi e Ercolini, 1986 per una revisione). Accanto ad essi è stata rilevata anche l'importanza di fattori locali quali il paesaggio (Williamson, 1954; Ugolini et al., 1986), alcune caratteristiche del substrato (pendenza ed umidità della sabbia) (Ercolini e Scapini, 1974; Ugolini et al., 1986).

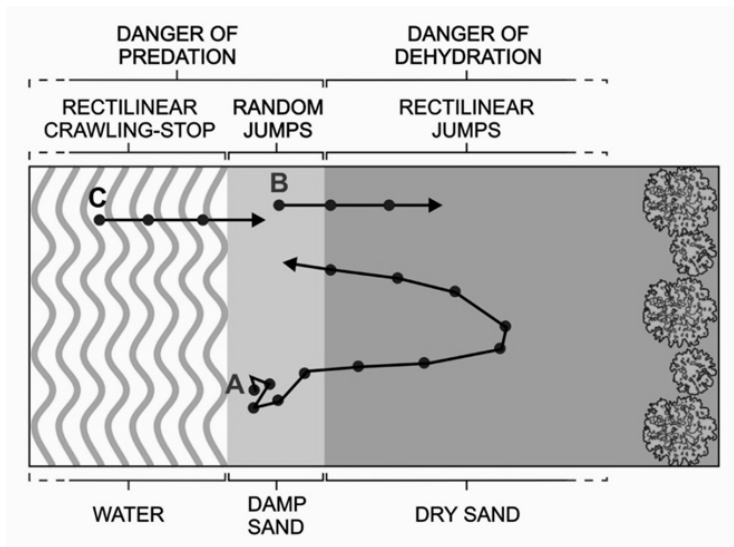


Fig. 2. Rappresentazione schematica delle traiettorie seguite da *Talitrus saltator* nel recupero zonale quando si trova: A) sulla sabbia umida B) durante le escursioni alimentari notturne verso le dune, C) in acqua. Da Ugolini 1996, modificato.

1.1. L'INQUINAMENTO AMBIENTALE

“L'inquinamento è una modificazione sfavorevole di un ambiente naturale dovuta completamente o parzialmente all'attività umana, con interventi diretti o indiretti, che alterano le caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua, i flussi di energia e la struttura e abbondanza delle associazioni dei viventi” (definizione dell' Ecological Society of America).

La aree costiere presentano, oltre ad una notevole concentrazione di nutrienti, anche una rilevante quantità e varietà di agenti inquinanti la cui

presenza può arrecare danno alle comunità naturali che vi risiedono. L'inquinamento è senza dubbio tra i fenomeni più pericolosi sia per la salute umana che per l'ambiente e, per tale motivo, è tra quelli che hanno ricevuto maggiore attenzione.

Un gran numero di sostanze tossiche può essere immesso dall'uomo nell'ambiente marino e questo può avvenire come singolo episodio accidentale, spesso catastrofico, oppure come immissione continua di piccoli quantitativi come avviene, ad esempio, in certi processi industriali. Nel corso degli ultimi anni il crescente aumento della contaminazione delle acque con elementi in traccia, soprattutto delle zone costiere a causa del maggiore apporto antropico (scarichi industriali, agricoli e domestici), ha reso necessario un approfondimento della conoscenza della diffusione di tali sostanze nell'ambiente per verificare lo stato di salute degli ecosistemi naturali.

1.1.1. BIOACCUMULO

Per valutare lo stato della contaminazione ambientale nelle aree costiere la concentrazione degli inquinanti può essere misurata nell'acqua, nel sedimento e negli organismi. La determinazione della concentrazione di composti inquinanti nel medium acquoso, oltre a fornire, molto spesso, valori inferiori ai limiti di rilevanza delle apparecchiature e a presentare difficoltà metodologiche, restituisce indicazioni riguardanti la quantità di contaminante presente in un singolo momento nel tempo e che può essere notevolmente diversa rispetto al giorno precedente o al giorno seguente (Rainbow, 2006; Luoma e Rainbow, 2008). Ad esempio, in modo particolare per gli estuari, la concentrazione di inquinante disciolto in acqua varia a seconda del regime tidale, dell'input dei fiumi e della loro portata che a sua volta dipende dall'intensità delle precipitazioni nel bacino idrografico. Pertanto, per ottenere una stima realistica dello stato della contaminazione ambientale mediante l'analisi della concentrazione nell'acqua è necessario realizzare campionamenti intensivi, ed economicamente molto dispendiosi. Inoltre, la concentrazione determinata in acqua non fornisce alcuna indicazione sulla quantità di inquinante biodisponibile di conseguenza sono necessari ulteriori elaborazioni dei dati usando, ad esempio, complessi modelli di speciazione chimico-fisico per ottenere valutazioni realistiche.

Il secondo metodo di misura per la valutazione della distribuzione dei contaminanti negli ambienti riguarda la loro determinazione nel sedimento. A differenza del medium acquoso, la quantità determinata nei sedimenti è sufficientemente elevata da poter essere facilmente quantificata dagli strumenti di analisi e, inoltre, fornisce una stima integrata per un determinato periodo di tempo e non necessita di intense campagne di campionamento. Tuttavia, anche per quel che riguarda l'analisi del sedimento esistono delle difficoltà in quanto alcune caratteristiche chimico - fisiche (come ad esempio il diametro delle particelle e il contenuto in carbonio organico) possono influenzare la

concentrazione dei contaminanti. Ad esempio, sedimenti caratterizzati da un elevato contenuto di carbonio organico sono in grado di legare maggiori quantità di contaminanti organici. Per tale motivo il confronto tra concentrazioni di composti xenobiotici registrato in sedimenti provenienti da diverse località, ma con caratteristiche differenti, risulta non necessariamente realizzabile senza l'ausilio di ulteriori analisi sui campioni (Rainbow, 2006; Luoma e Rainbow, 2008).

Per valutare lo stato della contaminazione ambientale l'attenzione dei ricercatori si è concentrata sui biomonitori definiti da Rainbow (2006) come "quegli organismi in grado di accumulare composti inquinanti nei loro tessuti, la cui concentrazione può essere facilmente determinata per fornire una misura relativa della quantità totale di inquinante assimilata da un organismo, in un determinato intervallo di tempo, derivante da tutte le vie di assimilazione (ad esempio dieta e soluzione per gli organismi acquatici)".

I biomonitori possono essere utilizzati per stabilire variazioni geografiche e/o temporali della biodisponibilità di contaminanti nell'ambiente, e forniscono inoltre, misure integrate nel tempo riguardo la quantità di composti inquinanti ecotossicologicamente rilevanti (Rainbow, 2006; Luoma e Rainbow, 2008).

La quantità di un composto inquinante accumulata da un organismo dipende dalle caratteristiche della specie presa in esame. Infatti, differenti specie di invertebrati che vivono nello stesso habitat possono presentare concentrazioni molto differenti, come avviene nel caso di alcuni metalli pesanti, nonostante siano taxa strettamente imparentati o addirittura congenerici (Moore e Rainbow, 1987; Rainbow, 1998; Ugolini et al., 2005). Ad esempio, due specie sintopiche di anfipodi talitridi (*Talitrus saltator* e *Talorchestia ugolinii*) mostrano ampie differenze nella concentrazione di Cd, Hg, Cu e Zn probabilmente dovute a differenze ecofisiologiche (Calosi et al., 2007) e nella zonazione nel sopralitorale (Ugolini et al., 2005).

Inoltre, un ruolo chiave nel determinare differenze nel contenuto di inquinanti nei tessuti degli organismi viventi è svolto dall'entità dei processi di assimilazione, escrezione e detossificazione, anch'essi dipendenti da caratteristiche specie – specifiche del taxa preso in esame (Rainbow, 2002).

Nel caso dei crostacei, ad esempio, il decapode *Palaemon elegans* riesce a regolare la concentrazione di metalli (Cu e Zn) nei tessuti bilanciando i processi di escrezione in relazione alla biodisponibilità ambientale, mantenendo così inalterata la concentrazione dei due metalli interna in un ampio range di concentrazioni esterne (White e Rainbow, 1982). Nel balanide *Elminius modestus* l'accumulo di metalli avviene in forma detossificata (solitamente legati a granuli fosforici insolubili) senza escrezione. In questa specie, quindi, la concentrazione dei metalli cresce all'aumentare della biodisponibilità fino al manifestarsi dell'effetto tossico (Rainbow e White, 1989). Nell'anfipode talitride *Orchestia gammarellus* si assiste ad una situazione intermedia rispetto alle precedenti, con l'accumulo di metalli sotto forma di granuli insolubili, e

quindi non tossici, all'interno delle cellule dei ciechi intestinali (Weeks, 1992; Nassiri et al., 2000). Successivamente, alla fine del ciclo cellulare delle cellule intestinali, i granuli vengono rilasciati nel lume dell'intestino e così emessi all'esterno. Questo non è processo di regolazione della concentrazione interna di un metallo poiché l'aumento della concentrazione esterna determina un incremento della formazione di granuli insolubili e, di conseguenza, della concentrazione corporea. Si determina in questo modo il raggiungimento di un nuovo punto di equilibrio dipendente dalla biodisponibilità ambientale del metallo (Rainbow, 2002; Marsden e Rainbow, 2004).

Per le ragioni appena elencate è opportuno scegliere come biomonitor organismi in grado di accumulare inquinanti nei tessuti in concentrazioni crescenti in relazione alla biodisponibilità ambientale. Inoltre, nella scelta dell'organismo è opportuno considerare una serie di caratteristiche quali:

- sedentarietà (rappresentatività dell'area di studio)
- Optimum ecologico ed ampia distribuzione nell'area di studio.
- abbondanza e facilità di raccolta ed identificazione
- adeguate conoscenze sull'anatomia, fisiologia ed ecologia
- ciclo vitale sufficientemente lungo in modo da riflettere la biodisponibilità di inquinanti presenti in un determinato intervallo di tempo
- sensibilità agli inquinanti, ma non tale da precludere la sopravvivenza;
- capaci di tollerare elevate concentrazioni di contaminanti e ampie variazioni dei parametri chimico – fisici (ad esempio salinità e temperatura) dell'ambiente in cui vivono
- facilità di allevamento e stabulazione per permettere test in laboratorio

(da Vighi e Bacci, 1998; Rainbow, 2006; Luoma e Rainbow, 2008).

L'uso di specifici organismi (biomonitors) per la valutazione della qualità ambientale è alla base della definizione di "biomonitoraggio ambientale". Con il termine biomonitoraggio si intende la regolare e sistematica valutazione delle condizioni dell'ambiente mediante un insieme di metodiche scientifiche, che utilizzano specie animali o vegetali per misurare l'impatto degli agenti inquinanti sull'ambiente stesso. Data la facilità e i vantaggi determinati dall'utilizzazione degli organismi sia vegetali che animali, lo stato della contaminazione ambientale nelle aree costiere viene comunemente valutata tramite biomonitors. Per questo motivo, molte nazioni, sin dagli anni 70, hanno avviato programmi di monitoraggio per determinare variazioni nel tempo e nello spazio dei principali contaminanti organici e inorganici. È opportuno ricordare, ad esempio, il Réseau National d'Observation de la qualité

du milieu marin (RNO) attivo in Francia dal 1979 e il programma National Status and Trends (NS&T) del National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) che conduce dal 1986 il programma Mussel Watch lungo le coste degli Stati Uniti mediante l'utilizzo di mitili. In Italia, il D.Lgs 152/2006 pone l'attenzione sul monitoraggio e classificazione delle acque, tra cui quelle di transizione, per l'identificazione dello stato ecologico in funzione degli obiettivi di qualità ambientale. Tra gli elementi da identificare per la classificazione dei corpi idrici sono stati individuati indicatori biologici quali fitoplancton, macroinvertebrati e fauna ittica.

La presenza di sostanze tossiche può alterare lo stato di salute degli organismi provocando una sindrome da stress, cioè un'alterazione misurabile dello stato fisiologico indotta da un cambiamento ambientale che rende gli organismi più vulnerabili ad ulteriori variazioni ambientali. La sindrome da stress può essere opportunamente quantificata mediante l'utilizzo di opportuni indici di stress, noti anche con il termine di "biomarker".

1.1.2 BIOMARKERS

Per organismo sentinella si intende, in genere, un qualsiasi organismo (o insieme di organismi) che, mediante risposte identificabili a condizioni di stress, sia in grado di fornirci informazioni sulla qualità dell'ambiente e sui suoi cambiamenti; di conseguenza si definisce come biomarker quella risposta o quelle risposte che un organismo sentinella manifesta verso fattori di stress. La presenza (attuale, pregressa, momentanea, costante, ecc.) nell'ambiente di uno o più agenti inquinanti determina, quindi, alterazioni misurabili a livello della fisiologia, della morfologia o dell'organo o del tessuto di un determinato organismo.

L'utilizzazione dei biomarkers nel campo ecotossicologico è abbastanza recente e deriva dai metodi diagnostici applicati in campo medico: identificare tutti quei sintomi che rivelano l'esistenza di una patologia ancora non pericolosa per il paziente (Fossi, 2000; Amiard - Triquet, 2009). Quindi, della categoria dei biomarkers fanno parte tutte quelle risposte misurabili che un organismo, una popolazione, o una comunità naturale può generare nei confronti di uno stress chimico ambientale. Ciascuna di queste rappresenta un segnale integrato del livello di contaminazione di una determinata area e, di conseguenza, costituisce un indicatore del livello di rischio tossicologico a cui una determinata popolazione naturale può essere sottoposta.

Tra le varie definizioni coniate può essere citata quella formulata dalla National Academy of Science (NRC, 1989) che descrive il biomarker "quella variazione, indotta da un contaminante, a livello delle componenti biochimiche o cellulari di un processo, di una struttura o di una funzione, che può essere misurata in un sistema biologico". Negli ultimi anni il concetto di biomarker è stato modificato assumendo una valenza molto più ampia e completa. Depledge (1993), infatti, definisce i biomarkers come "quelle variazioni biochimiche,

cellulari, fisiologiche o comportamentali, che possono essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo (individuo o popolazione), che forniscono l'evidenza di un'esposizione e/o dell'effetto di uno o più composti inquinanti (e/o radiazioni)." Queste variazioni o risposte possono essere individuate a diversi livelli di complessità biologica e possono fornire informazioni sia qualitative che semiquantitative sulla natura dell'insulto sia sulla connessione fra effetti biologici e livelli di contaminazione ambientale. Uno dei concetti fondamentali su cui si basa questo approccio metodologico riguarda l'intercorrelabilità degli effetti di un contaminante tra i vari livelli di organizzazione biologica (Bayne et al., 1985). La tossicità primaria di un contaminante si esercita, in linea generale, a livello biochimico e molecolare (modificazioni di attività enzimatiche, alterazioni a livello del DNA, ecc.), e solo successivamente gli effetti si possono riscontrare, con un meccanismo a cascata, ai livelli successivi dell'organizzazione gerarchica (organulo cellulare, cellula, tessuto, organismo) fino a giungere il livello di popolazione e comunità (McCarthy e Shugart, 1990, Depledge e Fossi, 1994) permettendoci quindi di individuare prematuramente ("early warning") una possibile situazione ambientale critica prima che tale situazione si traduca in effetti gravi sulla biodiversità di un determinato ambiente.

I biomarkers, possono essere suddivisi in due categorie, in base alla loro specificità di risposta nei confronti degli agenti inquinanti, in biomarkers "specifici" e "generalisti":

- biomarkers generali

segnalano una risposta dell'organismo a un insieme di inquinanti, senza consentire di determinare la natura dei singoli contaminanti. Si tratta, per esempio, del tempo di sopravvivenza all'aria dei mitili (test dello stress su stress), della stabilità delle membrane dei lisosomi, dell'accumulo delle lipofuscine e della determinazione dei lipidi neutri nelle ghiandole digestive dei mitili;

- biomarkers specifici:

segnalano una risposta dell'organismo ad una specifica famiglia di inquinanti. Si tratta, per esempio, delle metallothioneine, proteine non enzimatiche caratterizzate da un elevato contenuto di cisteina, indotte dalla presenza metalli pesanti, oppure l'inibizione delle esterasi di tipo "B" (AChE, BChE e CbE) che rappresenta un segnale specifico dell'esposizione ad insetticidi neurotossici come i carbammati e i composti organofosforici.

In merito, invece, all'induzione della risposta, i biomarkers possono essere ulteriormente suddivisi in altre due categorie:

- biomarkers da esposizione:

forniscono informazioni sul grado di esposizione ad uno o più composti xenobiotici presenti nell'ambiente, ma non sugli effetti tossici che questi generano a livello dell'organismo (ad esempio inibizione delle esterasi plasmatiche BChE per opera degli insetticidi organofosforici)

- biomarkers di effetto:

indicano sia l'esposizione che l'effetto di un inquinante. Essi comprendono gli indici che riflettono una condizione di deterioramento dovuta all'esposizione ad un contaminante come ad esempio i danni ai tessuti o alle cellule, la riduzione della capacità riproduttiva e di sopravvivenza.

Sia i biomarkers da esposizione che quelli da effetto possono costituire risposte generali e specifiche.

1.1.2.1 Principali tipi di biomarkers

I biomarkers possono essere suddivisi in differenti categorie, oltre che in funzione della specificità di risposta, anche in base al livello gerarchico di organizzazione biologica (Fossi, 2000) (Tab. 1):

- alterazioni del DNA
- risposte di proteine
- alterazioni del sistema immunitario
- prodotti metabolici
- alterazioni istopatologiche
- biomarkers non specifici e fisiologici
- biomarkers comportamentali

Dall'utilizzo delle diverse classi si attendono risposte su scala temporale differente: precoci, (minuti e ore) per le risposte a livello molecolare e cellulare, e ritardate (giorni o settimane) per le risposte misurate a livello di organizzazione più elevata (organismo, popolazione e comunità) (Moore et al., 2004) (Fig. 3). Inoltre, la valutazione dei biomarkers a livello di organizzazione biologica più elevata riveste una notevole importanza ecologica, ma, allo stesso tempo, è molto più difficile da individuare e da mettere in relazione ad un determinato insulto chimico (Moore et al., 2004) (Fig. 3).

Alterazioni del dna

Molte sostanze inquinanti, tra cui gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e le diossine, hanno un effetto cancerogeno e mutageno e possono causare danni di diverso tipo al DNA quali addotti (come nel caso dell' IPA benzo(a)pirene), frammentazione dei cromosomi, rotture della doppia elica, mutazioni.

Alterazioni del sistema immunitario

Il sistema immunitario ha la capacità di distruggere e neutralizzare elementi estranei e di difendere l'organismo da agenti patogeni rappresentando, pertanto, un ottimo indicatore dello stato di stress ambientale a cui è sottoposto un organismo. L'aumento nel sangue di cellule con funzione di difesa o di anticorpi da esse sintetizzate oppure l'attivazione di risposte citotossiche negli

emociti rappresentano degli ottimi indicatori dello stato di salute di un organismo

Tab. 1. Principali biomarkers per il monitoraggio ambientale (da Fossi, 2000 modificato).

Biomarkers	Risposta biologica	Contaminanti	Tempo di risposta	Esposizione	Effetto
Alterazione DNA					
Rotture del DNA	Rottura doppia elica	PAH, PHAHs	Rapida	Si	SI
Addotti	Formazione addotti	PAH, PHAHs	Rapida	SI	Si
SCE	Alterazioni cromosomiche	PAH, PHAHs	Media	Si	Si
Risposte di proteine					
Esterasi	Inibizione enzimatica	OPs, CBs	Rapida	Si	Si
MFO	Inibizione enzimatica	PAH, PHAHs	Rapida	Si	Si
Proteine da stress	Induzione proteica	PAH, PHAHs, Metalli pesanti	Rapida	Si	No
Metallotioneine	Induzione proteica	Metalli pesanti	Rapida	Si	No
ALAD	Inibizione enzimatica	Piombo	Rapida	Si	No
Prodotti Metabolici					
Porfirine	Disordini metabolici del ciclo dell'EME	PAH, Metalli pesanti	Media	Si	No
Alterazioni del sistema immunitario					
Immunotossicologia	Varie	PAH, PHAHs, Metalli pesanti, OPs	Media	SI	No
Funzioni Tiroidee	Alterazione delle funzioni tiroidee	PHAHs	Media	Si	No

Note: CBs = Carbammati, OPs = Composti organofosforici, PAH = Idrocarburi Policiclici aromatici, PHAHs = Idrocarburi aromatici polialogenati, MFO =

Monossigenasi Funzione mista, MT = Metallotioneina, SCE = Sister chromatid exchanges, ALAD = acido aminolevulinico deidratasi

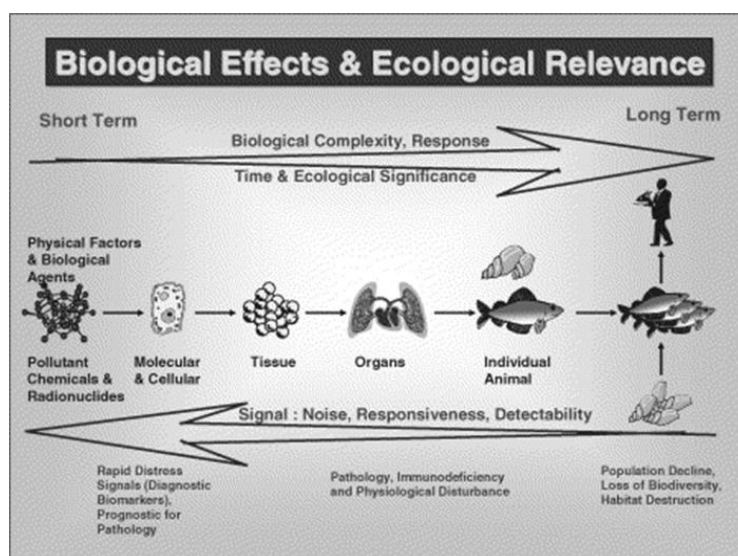


Fig. 3. Rappresentazione schematica della relazione tra individuazione e quantificazione di una risposta biologica (biomarker) e rilevanza ecologica (da Moore et al., 2004 modificato).

Alterazioni istopatologiche

Quale stadio finale del loro effetto tossico molti composti inquinanti provocano alterazioni istopatologiche in organi bersaglio come il fegato nei vertebrati, ghiandola digestiva nei molluschi ma anche pelle, apparato gastro-intestinale, sistema nervoso e organi riproduttori. I principali markers istologici che possono essere messi in relazione con la presenza di composti inquinanti sono, ad esempio, la necrosi epato - cellulare e l'iperplasia epatica.

Prodotti metabolici

Alcuni inquinanti possono alterare il normale metabolismo di composti endogeni e causare quindi l'accumulo di alcuni metaboliti intermedi come ad esempio le porfirine o l'acido aminolevulinico deidratasi (ALAD), la cui presenza indica contaminazione da piombo.

Biomarkers fisiologici ed aspecifici

Entrambi i tipi di biomarkers sono stati ampiamente utilizzati sia in natura che in laboratorio per evidenziare l'esposizione e l'effetto di composti xenobiotici. Alcuni dei più comuni biomarkers che fanno parte di questa categoria sono la misura della frequenza cardiaca, la valutazione delle riserve energetiche (glicogeno, lipidi e proteine), Scope for growth (SFC) e indici di

condizione (Condition Index). Tra le variabili fisiologiche che possono essere utilizzate per monitorare gli effetti della esposizione a contaminanti (metalli in traccia e IPA) negli invertebrati, le risposte respiratorie e cardiache occupano una posizione rilevante. In particolare, la misurazione della frequenza cardiaca, grazie alla messa a punto di tecniche di rilevazione non invasive (Depledge e Andersen, 1990) basate su rilevatori optoelettronici ad infrarossi, rappresenta un ottimo strumento di ricerca che può essere facilmente impiegato anche in organismi di dimensioni ridotte come crostacei anfipodi (ad esempio si veda Calosi et al., 2003), crostacei decapodi (ad esempio si veda Bini e Chelazzi, 2006; Ungherese et al., 2008) e molluschi (Chelazzi et al., 2001; De Pirro et al., 2001).

Risposte in termini di proteine

Fanno parte di questa categoria tutte quelle variazioni dell'attività proteica (attivazione o inibizione) che un organismo produce in seguito all'esposizione a composti inquinanti. Di questo gruppo fanno parte alcune delle risposte più studiate come il sistema delle monoossigenasi a funzione mista (MFO), le metallotioneine (MT), le esterasi, le proteine da stress (HSP-60, HSP-70). L' induzione dell'attività proteica è un meccanismo di detossificazione messo in atto dall'organismo in risposta ad un insulto chimico (ad esempio l'induzione delle MT in risposta alla contaminazione da metalli pesanti) mentre, fanno parte della categoria delle inibizioni le esterasi ematiche e cerebrali che si verificano in risposta alla contaminazione da insetticidi organofosforici.

Biomarkers comportamentali

Le alterazioni a livello comportamentale rappresentano il più alto livello d'organizzazione biologica nel quale è possibile valutare la risposta in termini di biomarkers. L'introduzione delle risposte comportamentali tra i biomarkers è avvenuta recentemente (Depledge, 1993) nonostante i loro vantaggi applicativi. Infatti i biomarkers comportamentali, oltre a rappresentare una risposta integrata dei processi che avvengono a livello biochimico e fisiologico, sono ecologicamente rilevanti ed, inoltre, caratterizzati da un'elevata sensibilità agli inquinanti (Wallace e Estephan, 2004; Amiard-Triquet, 2009). Nonostante che il ruolo chiave del comportamento sia noto da tempo e sia supportato da consistenti evidenze sperimentali, i tentativi di utilizzarlo come biomarker sono piuttosto limitati (es Michels et al., 2000; Roast et al., 2000; Wallace e Estephan, 2004).

1.1.2.2 Limiti e vantaggi nell'utilizzo dei biomarkers

Nel valutare le risposte ottenute dall'approccio basato sui biomarkers bisogna considerare che esistono, oltre alla presenza di contaminanti, altri fattori fisiologici, biologici o ambientali che possono alterare il segnale fornito

dall'organismo sentinella e portare a conclusioni errate. Alcune reazioni enzimatiche, ad esempio, subiscono modificazioni in funzione dello stato ormonale, del sesso, dell'età e della dimensione dell'organismo (Fossi, 2000). Questi limiti possono essere superati con una buona conoscenza delle caratteristiche fisiologiche e del ciclo vitale dell'organismo preso in esame. In natura, inoltre, gli esseri viventi sono sottoposti ad un numero elevato di fattori di stress chimico – fisico come temperatura, salinità, umidità, pH, concentrazione di ossigeno, che influenzano le risposte ai vari livelli di organizzazione biologica. Per tale motivo è importante separare ed identificare gli effetti della presenza di contaminanti dalle variazioni indotte da altri fattori abiotici.

Uno dei limiti più importanti dell'utilizzazione dei biomarkers, misurati a livello cellulare, biochimico e fisiologico, è che forniscono informazioni riguardo l'avvenuta esposizione ad inquinanti ma non consentono di effettuare alcuna previsione riguardo i possibili effetti negativi ad un più alto livello di organizzazione biologica (Forbes et al., 2006) impedendo così una più completa valutazione del rischio ecologico. Tra le numerose metodologie proposte per superare tale limite, quella basata sull'impiego dei biomarkers comportamentali ha riscosso maggior successo tanto da essere definiti recentemente come “The missing link between sub – organismal and supra – organismal response to stress” (Amiard – Triquet, 2009). Infatti, le risposte comportamentali, oltre ad essere in stretta relazione con l'ambito fisiologico e biochimico, hanno chiare connessioni con gli effetti che si manifestano a livello di popolazione attraverso alterazioni del successo riproduttivo e del tasso di sopravvivenza (Amiard – Triquet, 2009). Ad esempio, l'idrocarburo policiclico aromatico naftalene, disturbando la comunicazione basata su feromoni nell'Anfipode *Corophium volutator* durante l'accoppiamento, può indurre cambiamenti sia a livelli di popolazione sia di comunità (Krång, 2007).

1.2. GLI ANFIPODI TALITRIDI ED IL LORO IMPIEGO NEL MONITORAGGIO AMBIENTALE

Nel corso degli ultimi anni numerosi organismi (alghe, fanerogame marine, anellidi, molluschi e crostacei, principalmente decapodi, balanidi e anfipodi) sono stati proposti come biomonitors della contaminazione ambientale della zona intertidale di coste rocciose e del litorale sommerso (si veda ad esempio Rainbow e Phillips, 1993; Zhou et al., 2008). L'attenzione è stata recentemente rivolta agli anfipodi talitridi come possibili biomonitors della fascia sopralitorale delle spiagge sabbiose, un ambiente ecotonale di notevole importanza ecologica, caratterizzato dal notevole input di sostanze inquinanti la cui origine può essere sia marina che terrestre. I talitri, crostacei di piccole dimensioni che abitano la zona umida del sopralitorale di coste sabbiose, nutrendosi di materiale di origine sia marina che terrestre, integrano le diverse vie di contaminazione. Studi condotti principalmente sulle spiagge sabbiose

nord europee (Moore e Rainbow 1987, Moore et al., 1991; Rainbow et al., 1989, 1998; Fialkowski et al., 2000, 2003, 2009) e lungo le coste del Pacifico meridionale (Rainbow et al., 1993; Marsden et al., 2003) hanno mostrato l'importanza di diverse specie di anfipodi sopralitorali (*T. saltator*, *O. gammarellus*, *Orchestia mediterranea*, *Platorchestia platensis*, *Deshayesorchestia deshayesii*, *Talorchestia quoyana*, *Transorchestia chileensis*) come biomonitor della contaminazione da metalli pesanti, in modo particolare Cu e Zn (si veda Marsden e Rainbow, 2004 per una revisione). Studi condotti lungo le coste italiane e corse hanno dimostrato il possibile impiego di questi crostacei come biomonitor anche nel bacino del Mediterraneo e dimostrato, inoltre, le elevate doti di bioaccumulo di Cd, Hg, Al e Fe, oltre a Cu, Zn, da parte di una delle più comuni specie europee: *T. saltator* (Ugolini et al., 2004, 2005; Fialkowski et al., 2009).

La concentrazione di un composto inquinante nei tessuti dei talitri, così come per gli altri organismi utilizzati come biomonitor, è il risultato dei processi di assimilazione, escrezione e detossificazione. Il processo di assimilazione dipende, oltre che dalle caratteristiche dell'organismo, soprattutto dalla biodisponibilità degli inquinanti (Marsden e Rainbow, 2004). Inoltre, le diverse concentrazioni di metalli pesanti accumulati nei tessuti degli anfipodi talitridi, oltre a riflettere la biodisponibilità nell'ambiente, risultano dipendenti dal peso corporeo. Infatti, numerosi studi (Amiard et al., 1987; Rainbow et al., 1989, 1998; Moore et al., 1991; Fialkowski et al., 2000, 2003) hanno evidenziato l'esistenza di una relazione tra concentrazione dei metalli nei tessuti (y) delle più comuni specie europee (*T. saltator* e *O. gammarellus*) e peso secco (x) espressa dalla funzione $y = ax^b$ (Amiard, 1987; Rainbow et al., 1986, 1989, 1998; Moore et al., 1991; Fialkowski et al., 2000, 2003). Per *T. saltator* tale relazione è stata dimostrata per molti metalli tra cui Zn, Cu, Cd, Ni e Fe, anche se, è opportuno sottolineare, che l'effetto delle dimensioni corporee risulta minimo, o quasi assente, per individui adulti con peso secco maggiore di 2 mg (Rainbow et al., 1998).

Le principali fonti da cui i talitri assimilano i metalli sono rappresentate dal cibo e dal medium acquoso (Week e Rainbow, 1991, 1993) (Fig. 4). Tuttavia, nonostante i talitri vivano in stretto contatto con il substrato e possono probabilmente ingerire insieme al cibo particelle di sabbia, le ricerche riguardanti la possibile importanza del sedimento come fonte di metalli in traccia sono quasi assenti (Marsden e Rainbow, 2004).

L'escrezione dei metalli avviene principalmente attraverso le ghiandole antennali, le branchie, l'intestino e il processo di muta (Fig. 4), mentre, per quel che riguarda i processi di immagazzinamento e detossificazione le ricerche sono scarse o quasi assenti. Le uniche informazioni disponibili riguardano *O. gammarellus* in cui è stato evidenziato il ruolo chiave svolto dalle cellule dei ciechi ventrali dell'intestino nella detossificazione degli eccessi di Cu, Cd e Zn (Weeks et al., 1992; Nassiri et al., 2000) (Fig. 4).

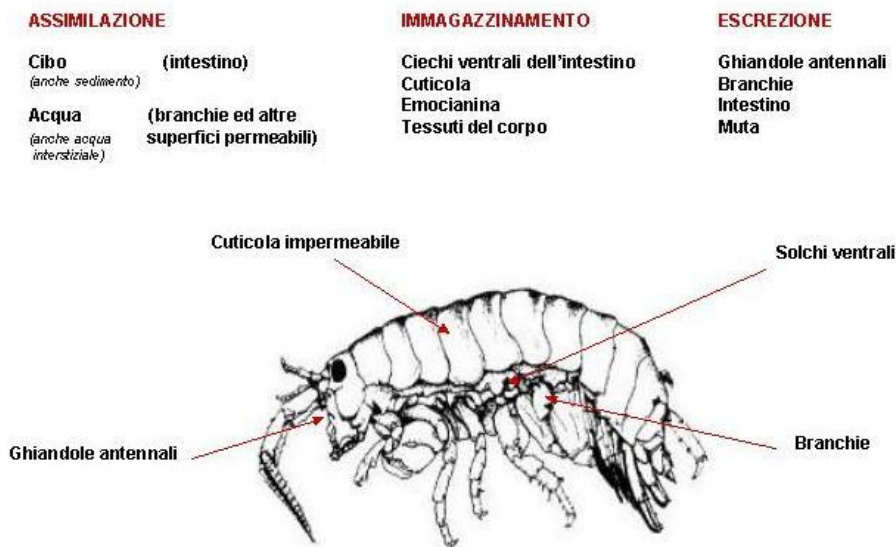


Fig. 4. Il diagramma mostra le principali vie di assimilazione, immagazzinamento ed escrezione dei metalli in traccia in un anfipode talitride (da Marsden e Rainbow, 2004 modificato).

Nonostante l'ampio utilizzo degli anfipodi talitridi come biomonitor, le ricerche nel campo dei biomarkers condotte su questi crostacei sono quasi assenti e gli unici dati disponibili in letteratura riguardano l'induzione delle metallotioneine in *O. gammarellus* (Mouneyrac et al., 2002).

Nell'ottica di una gestione eco-sostenibile delle zone litorali è opportuno, inoltre, considerare tutti quei fattori, associati all'impatto antropico, che esercitano un'influenza negativa sulle comunità naturali. Tra questi è necessario prendere in considerazione, oltre alla contaminazione ambientale, tutti gli effetti diretti legati principalmente alla frequentazione turistica quali il calpestio e la pulizia del litorale con conseguente asportazione del materiale organico spiaggiato e della fauna ad esso associata. A tal proposito è necessaria una verifica dell'impatto che queste attività producono sulla fauna del sopralitorale. Tale fauna –anfipodi ed isopodi soprattutto- svolge un ruolo centrale nella decomposizione della sostanza organica e quindi sul flusso di energia degli ecosistemi litorali sabbiosi. Il confronto fra i risultati di indagini quantitative e ripetute nel tempo, eseguite in zone a diversa frequentazione turistica, possono fornire un utile strumento di valutazione ai fini sia di una gestione più responsabile sia per una migliore tutela della biodiversità delle zone costiere.

1.3. SCOPI DELLA TESI

L'obiettivo principale di questa tesi è di valutare l'utilizzazione dell'anfipode talitride *T. saltator* come bioindicatore dei litorali sabbiosi attraverso un approccio ecotossicologico basato sul bioaccumulo e sulle risposte biologiche in termini di biomarkers.

Sono stati presi in esame sia alcuni dei più comuni biomarkers come metallotioneine e variabilità genetica ed inoltre, particolare attenzione è stata rivolta ai biomarkers comportamentali che, nonostante i loro innumerevoli vantaggi applicativi, hanno ricevuto, ad oggi, scarsa attenzione da parte della comunità scientifica.

In dettaglio i principali obiettivi di questa tesi sono stati:

- Determinare la possibile esistenza di variazioni nel contenuto di metalli in traccia tra diverse località e, quindi, il possibile impiego di *T. saltator* come indicatore della distribuzione spaziale della contaminazione da metalli in traccia.
- Valutazione del possibile utilizzo delle metallotioneine, proteine non enzimatiche implicate nella detossificazione dell'eccesso di metalli, come biomarkers dell'esposizione a Hg, Cu e Cd.
- L'eventuale relazione tra variabilità genetica e inquinamento da metalli in traccia in otto popolazioni mediterranee dell'anfipode *T. saltator*, provenienti da località caratterizzate da un diverso grado di contaminazione ambientale.
- Valutazione della possibilità di utilizzare biomarkers comportamentali per valutare l'esposizione a metalli in traccia. In particolare sono state analizzate:
 - a) le risposte foto tattiche
 - b) la capacità di orientamento solare
 - c) l'attività locomotoria
 - d) il comportamento di evitamento di substrato
- Sono state effettuate indagini per stabilire l'eventuale importanza del sedimento come fonte di metalli assimilabili in *T. saltator*.
- Valutare la possibile influenza di diversi cationi sul meccanismo di orientamento solare in *T. saltator*.
- Valutare il possibile utilizzo di *T. saltator* come bioindicatore della frequentazione turistica, e in modo particolare dell'human trampling, degli ecosistemi sabbiosi litorali.

1.4. BIBLIOGRAFIA

- Amiard, J.C., Amiard – Triquet, C., Berthet, B. & Metayer, C.** 1987. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **106**, 73-89.
- Amiard – Triquet, C.** 2009. Behavioral disturbances: The missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects Based on Aquatic Research. *Human and Ecological Risk Assessment* **15** (1), 87-110.
- Bayne, B.L., Brown, D.A., Burns, K., Dixon, D.R., Ivanovici, A., Livingstone, D.R., Lowe, D.M., Moore, M.N., Stebbing, A.D.R. & Widdows, J.**, 1985. *The effects of stress and pollution on marine animals*. Praeger Scientific, NY, USA
- Bergerard, J.** 1989. Ecologie des laisses de marée. *Année Biologique* **28**, 39-54.
- Bini, G. & Chelazzi, G.** 2006. Acclimatable cardiac and ventilatory responses to copper in the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Comparative Biochememistry and Physiology C*, **144**, 235-241.
- Brown, A.C. & McLachlan, A.** 2006. *Ecology of Sandy Shores*. Elsevier, Amsterdam.
- Calosi, P., Chelazzi, G. & Ugolini, A.** 2003. Optocardiographic recording of the heart rate in *Talitrus saltator* (Amphipoda: Talitridae). *Physiological Entomology*, **28**, 344-348.
- Calosi, P., Morritt, D., Chelazzi, G. & Ugolini, A.** 2007. Physiological capacity and environmental tolerance in two sandhoppers species with contrasting geographical ranges: *Talitrus saltator* and *Talorchestia ugolinii*. *Marine Biology* **151**, 1647-1655.
- Chelazzi, G., De Pirro, M. & Williams, G.A.** 2001. Cardiac responses to abiotic factors in two tropical limpets, occurring at different levels of the shore. *Marine Biology*, **139**, 1079-1085.
- Chelazzi, G. & Vannini, M.** 1988. *Behavioural adaptations to intertidal life*. ASI Series Vol. **151**, Plenum Press, New York..
- Ercolini, A & Scapini, F.** 1974. Sun compass and shore slope in the orientation of littoral amphipods (*Talitrus saltator* Montagu). *Monitore Zoologico Italiano (N.S.)*, **8**, 85-115.
- Fossi, M.C.** 2000. *Biomarkers: strumenti di diagnosi e prognosi ambientale*. Rosini Editrice, Firenze.
- Defeo, O., McLachlan, A., Schoeman, D.S., Schlacher, T.A., Dugan, J., Jones, A., Lastra, M. & Scapini, F.** 2009. Threats to sandy beach ecosystems: A review. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **81**, 1-12.
- De Pirro, M., Chelazzi, G., Borghini, F. & Focardi, S.** 2001. Variations in cardiac activity following acute exposure to copper in three co-occurring but

differently zoned Mediterranean limpets. *Marine Pollution Bulletin*, **42**, 1390-1396.

Depledge, M.H. 1993. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tool. In: *Nondestructive biomarkers in vertebrates* (Ed by M.C. Fossi & C. Leonzio), pp. 261-285. Lewis publication, Boca Raton, FL, USA.

Depledge, M.H. & Andersen, B.B. 1990. A computer-aided physiological monitoring system for continuous, long term recording of cardiac activity in selected invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **96**, 473-477.

Depledge, M.H. & Fossi, M.C. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology* **3**, 161-172.

Fialkowski, W., Calosi, P., Dahlke, S., Dietrich, A., Moore, P.G., Olenin, S., Persson, L.E., Smith, B.D., Špegys, M. & Rainbow, P.S. 2009. The sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda) as biomonitor of trace metals bioavailability in European coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, **58**, 39-44.

Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Fialkowska, E. & Smith, B.D. 2000. Biomonitoring of trace metals along the Baltic Coast of Poland using the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea: Amphipoda). *Ophelia*, **52**, 183-192.

Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Smith, B.D. & Zmudzinski, L. 2003. Seasonal variation in trace metal concentrations in three talitrid amphipods from the Gulf of Gdansk, Poland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **288**, 81-93.

Forbes, V.E., Palmqvist, A. & Bach, L. 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25**, 272-280.

Geppetti L. & Tongiorgi P. 1967. Nocturnal migration of *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda). *Monitore Zoologico Italiano (N.S.)*, **1**, 37-40.

Griffiths, C.L., Stenton - Dozey, J.M.E. & Koop, K. 1983. Kelp wrack and the flow of energy through a sandy beach ecosystem. In: *Sandy beaches as ecosystems* (Ed. by A. McLachlan & T. Erasmus), pp. 547-556, Junk Publ., The Hague.

Halpern, B.S., Walbridge, S., Selkoe, K.A., Kappel, C.V. Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J.F., Casey, K.S., Ebert, C., Fox, H.E., Fujita, R., Heinemann, D., Lenihan, H.S., Madin, E.M.P. Perry, M.T., Selig, E.R., Spalding, M., Steneck, R. & Watson, R. 2008. A global map of human impact on marine ecosystems. *Science* **319**, 948-952.

Krång, A.S. 2007. Naphthalene disrupts pheromone induced mate search in the amphipod *Corophium volutator* (Pallas). *Aquatic Toxicology*, **85**, 9-18.

Luoma, S.N. & Rainbow, P.S. 2008. *Metal contamination in aquatic environments: Science and lateral management*. Cambridge University Press, Cambridge.

Marsden, I.D., Rainbow, P.S. & Smith, B.D. 2003. Trace metal concentration in two New Zealand talitrid amphipods: effects of gender and reproductive state and implication for biomonitoring. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **290**, 93-113.

Marsden, I.D. & Rainbow, P.S. 2004. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology - the amphipod example? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **300**, 373-408.

McCarthy, J.F. & Shugart, L.R. 1990. *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Publisher, Boca Raton, FL, USA.

Michels, E., Semsari, S., Bin C. & De Meester, L. 2000. Effect of sublethal doses of cadmium on the phototactic behavior of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **47**, 261-265.

Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W. & Leonard, D.R.P. 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research*, **522**, 247-268.

Moore, P.G. & Rainbow, P.S. 1987. Copper and zinc in an ecological series of talitroidean Amphipoda (Crustacea). *Oecologia*, **73**, 120-126.

Moore, P.G., Rainbow, P.S. & Hayes, E. 1991. The beach-hopper *Orchestia gammarellus* (Crustacea: Amphipoda) as a biomonitor for copper and zinc: North Sea trials. *Science of the Total Environment*, **106**, 221-238.

Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Cottier, A., Rainbow, P.S. & Smith, B.D. 2002. Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, **57**, 225-242.

Nassiri, Y., Rainbow, P.S., Amiard-Triquet, C., Rainglet, F. & Smith, B.D. 2000. Trace-metal detoxification in the ventral caeca of *Orchestia gammarellus* (Crustacea: Amphipoda). *Marine Biology*, **136**, 477-484.

Nordstrom, K.F. (2008). *Beach and dune restoration*. Cambridge University Press, Cambridge.

Palluault, M. 1954. Notes ecologiques sur le *Talitrus saltator*. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, **91**, 105-129.

Pardi, L. & Ercolini, A. 1986. Zonal recovery mechanism in talitrid crustaceans. *Bollettino di Zoologia*, **53**, 139-160.

Pardi, L. & Papi, F. 1953 Ricerche sull'orientamento di *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea Amphipoda). I. L'orientamento durante il giorno in una popolazione del litorale tirrenico. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, **35**, 490-518..

Rainbow, P.S. 1998. Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans. In: *Metal metabolism in aquatic environments* (Ed. by W.J Langston and M.J. Bebianno), pp. 285-319, Chapman and Hall, London.

Rainbow, P.S. 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution*, **120**, 497-507.

- Rainbow, P.S.** 2006. Biomonitoring of trace metals in estuarine and marine environments. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, **12**, 107-122.
- Rainbow, P.S. & Phillips, D.J.H.** 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*, **26**, 593-601.
- Rainbow, P.S. & White, S.L.** 1989. Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia*, **174**, 245-262.
- Rainbow, P.S., Moore, P.G. & Watson, D.** 1989. Talitrid amphipods (Crustacea) as biomonitors for copper and zinc. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **28**, 567-582.
- Rainbow, P.S., Emson, R.H., Smith, B.D., Moore, P.G. & Mladenov, P.V.** 1993. Talitrid amphipods as biomonitors of trace metals near Dunedin, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **27**, 201-207.
- Rainbow, P.S., Fialkowski, W. & Smith, B.D.** 1998. The sandhopper *Talitrus saltator* as a trace metal biomonitor in the Gulf of Gdansk, Poland. *Marine Pollution Bulletin*, **36**, 193-200.
- Roast, S.D., Widdows, J. & Jones, M.B.** 2000. Mysids and trace metals: disruption of swimming as a behavioural indicator of environmental contamination. *Marine Environmental Research*, **50**, 107-112.
- Rüppel, G.** 1967. Tagesrhythmsche und langfristige Faunenverschiebungen in marinen supralitoral. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, **60**, 338-375.
- Schlacher, T.A., Dugan, J., Schoeman, D.S., Lastra, M., Jones, A., Scapini, F., McLachlan, A. & Defeo, O.** 2007. Sandy beaches at the brink. *Diversity and Distribution*, **13**, 556-560.
- Ugolini, A.** 1989. Orientation in the water and antipredatory behaviour in sandhoppers. *Marine Behaviour and Physiology*, **14**, 223-230.
- Ugolini, A., Borghini, F., Calosi, P., Bazzicalupo, M., Chelazzi, G. & Focardi, S.** 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 526-532.
- Ugolini, A., Borghini, F., Focardi, S. & Chelazzi, G.** 2005. Heavy metals accumulation in two syntopic sandhopper species: *Talitrus saltator* (Montagu) and *Talorchestia ugolinii* (Bellan Santini and Ruffo). *Marine Pollution Bulletin*, **50**, 1328-1334.
- Ugolini, A., Scapini, F. & Pardi, L.** 1986. Interaction between solar orientation and landscape visibility in *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda). *Marine Biology*, **90**, 449-460.
- Ungherese, G., Boddi, V. & Ugolini, A.** 2008. Eco-Physiology of *Palaemonetes antennarius* (Crustacea, Decapoda): the influence of temperature and salinity on cardiac frequency. *Physiological Entomology*, **33**, 155-161.

Wallace, W.G. & Estephan, A. 2004. Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium in a gammaridean amphipod (*Gammarus lawrencianus*). *Aquatic Toxicology*, **69**, 289-297.

Weeks, J.M. 1992. Copper-rich granules in the ventral caeca of talitrid amphipods (Crustacea; Amphipoda: Talitridae). *Ophelia*, **36(2)**, 119-133.

Weeks, J.M. & Rainbow, P.S. 1991. The uptake and accumulation of zinc and copper from solution by two species of talitrid amphipods (Crustacea). *Journal of Marine Biology Association of UK*, **45**, 811-826.

Weeks, J.M. & Rainbow, P.S. 1993. The relative importance of food and seawater as sources of copper and zinc to talitrid amphipods (Crustacea; Amphipoda; Talitridae). *Journal of Applied Ecology*, **30**, 722-735

Vighi, M. & Bacci, E. 1998. *Ecotossicologia. Trattato di tossicologia e terapia*. UTET, Torino.

White, S.L. & Rainbow, P.S. 1982. Regulation and accumulation of copper, zinc and cadmium by the shrimp *Palaemon elegans*. *Marine Ecology Progress Series*, **8**, 95-101.

Wildish, D.J. 1988. Ecology and natural history of aquatic Talitroidea. *Canadian Journal of Zoology*, **66**, 2340-2359.

Williams, J.A. 1995. Burrow - zone distribution of the supralittoral amphipod *Talitrus saltator* on Derbyhaven Beach, Isle of Man: a possible mechanism for regulating desiccation stress? *Journal of Crustacean Biology*, **15**, 466-475.

CAPITOLO 2

Evaluation of trace metals contamination along the Tuscan and Corsican coast (north Mediterranean, Italy) using the supralittoral amphipod *Talitrus saltator* (Montagu)

I risultati presentati in questo capitolo, attualmente in preparazione per la pubblicazione, sono stati ottenuti in collaborazione con il Dott. Davide Baroni (Dipartimento di scienze ambientali, Università di Siena), Prof. Silvano Focardi (Dipartimento di scienze ambientali, Università di Siena), Prof. A. Ugolini.

1. INTRODUCTION

Coastal areas, the natural interface between water and land, are valuable ecosystems since they are characterized by high biodiversity value because host many populations of invertebrates, diatoms, bacteria and algae with peculiar morphological and eco - physiological characteristics (Brown e McLachlan, 1994; Defeo and McLachlan, 2005). A wide range of human activities, such as fisheries, land reclamation, engineering, shipping and recreational activities, impacts coastal ecosystems (Schlacher et al., 2007; Defeo et al., 2009). Moreover the impact of pollution in coastal areas is generally relevant and the contaminants of main concern include persistent organic pollutants, oil, radionuclides, fertilizers, heavy metals and pathogens (Islam and Tanaka, 2004). Heavy metals are toxic and non-degradable elements that generate adverse effects on the living organisms (e.g. immunodeficiency, negative effect on metabolic process and permeability of cell membrane) (Ikem and Egiebor, 2005). These elements occur naturally but their input has been enhanced, since thousands years ago, by many anthropogenic activities (mining, metallurgic and tanning industries, chemical plant, paper mill) (Islam and Tanaka, 2004).

For a better management of the heavy metals pollution in coastal areas the distributions of contaminants should be easily assessed (Luoma and Rainbow, 2008). Biomonitoring (organisms that accumulates chemical contaminants in their tissues t proportionally to the environmental bioavailability) are routinely employed for this purpose (Rainbow, 2006; Luoma and Rainbow, 2008). Indeed, since seventies some nations have developed specific programs using mussels to establish geographical and/or temporal variations in the bioavailabilities of contaminants in coastal areas (e.g. Mussel watch and RNO). The accumulated contaminant offer time-integrated measures of the amount of pollutants, deriving from all routes of uptake (e.g. diet and solution for aquatic organisms), that are ecotoxicologically relevant (Rainbow, 1995; Luoma and Rainbow, 2008). Among the organisms employed as biomonitors, there are various species of macroalgae, seagrasses, fish, anellids, molluscs and crustaceans, (especially decapods, barnacles and amphipods) (e.g. see Rainbow and Phillips, 1993; Luoma and Rainbow, 2008).

Talitrid amphipods represent a key species in the energy flow of sandy shores ecosystems (Griffiths et al., 1983). In fact, feeding on terrestrial and marine material, these species integrate the different sources of contamination and constitute an important source of food for many species of invertebrates, fish and birds (Griffiths et al., 1983; Bergerard, 1989). Moreover studies carried out mainly on northern European sandy shores have shown that many species of supralittoral amphipods are good biomonitors of heavy metals contamination (see Marsden and Rainbow 2004 for a review). In particular the sandhoppers *Talitrus saltator* has been successfully employed as biomonitor of trace metals contaminations of the supralittoral band of both Atlantic and Mediterranean

sandy shores of Europe (Moore and Rainbow, 1987; Rainbow et al., 1989; 1998; Fialkowski et al., 2000; 2003; 2009; Ugolini et al., 2004; 2005).

The Tuscan coast (North Mediterranean, Italy) is not a pristine area free from contamination (e.g. Ferrara et al., 1993; Leoni e Sartori, 1996, 1997; ARPAT, 2007). Indeed this region is affected by the presence of important harbour (Livorno, Piombino), industrial activities (Rosignano Solvay) and rivers discharge (from fairly big towns). However it is also characterized by the presence of many Natural Park and protected areas (e.g. Migliarino, S.Rossore and Massaciuccoli and Maremma Regional Park, Arcipelago Toscano National Park). In contrast, most part of the Corsica Island (France) is considered a pristine area subjected to few sources of anthropogenic contamination (e.g. Andral et al., 2004; Galgani et al., 2006; Lafabrie et al., 2008). The available data regarding biomonitoring studies carried out along Tuscan coast are scanty and fragmented regarding the temporal and spatial scales and different organisms used as biomonitors (Ferrara et al., 1993; ARPAT, 2007). However, most part of the available data concerns, mainly, marine sediments (Ferrara et al., 1987; Barghigiani et al., 1996; Leoni e Sartori, 1996; 1997; ARPAT, 2007)

The objective of this work is to gain a more complete picture of metal pollution in the Tuscan coast using a well-known biomonitor: the amphipod *T. saltator*. Furthermore, samples were collected also in three localities along the Corsican coastline, considered as reference sites. Most of the localities selected in our study have already been object of investigations using the same species (Ugolini et al., 2004; 2005), so comparisons among different years are possible.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Sampling and samples preparation

Samples of sand and adult sandhoppers were collected, over a period of 15 days, in summer (June - July) 2005, 2006 and 2007 in 14 localities: 11 along the Tuscan coast and 3 along the occidental Corsica coastline (France) (Aleria, Tavignano, Ghisonaccia) (Fig. 1).

Of the 11 sampling sites of Tuscany, 4 are located inside the Regional Park of Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli (Pisa) (in the area included between the Arno and Serchio river mouth), 2 near the Albegna river mouth, 2 sites along the Feniglia sandbar (located at different distance from Argentario promontory) and, finally, samples were collected near the metallurgic area of Piombino (Cornia River mouth), at the Ombrone river mouth, and on the sandy beach close to the chemical plant of Rosignano Solvay (Fig. 1). Unfortunately, samples of amphipods were not found at Serchio River mouth (2005), at the 2 sites along the Feniglia sandbar (2005) and Aleria (2007). After collection sandhoppers were brought to the laboratory, within few hours, in plastic cold boxes with sand from the same place where the sandhoppers were captured. Once transferred to the laboratory, animals were rinsed in double distilled water and subsequently killed by freezing.

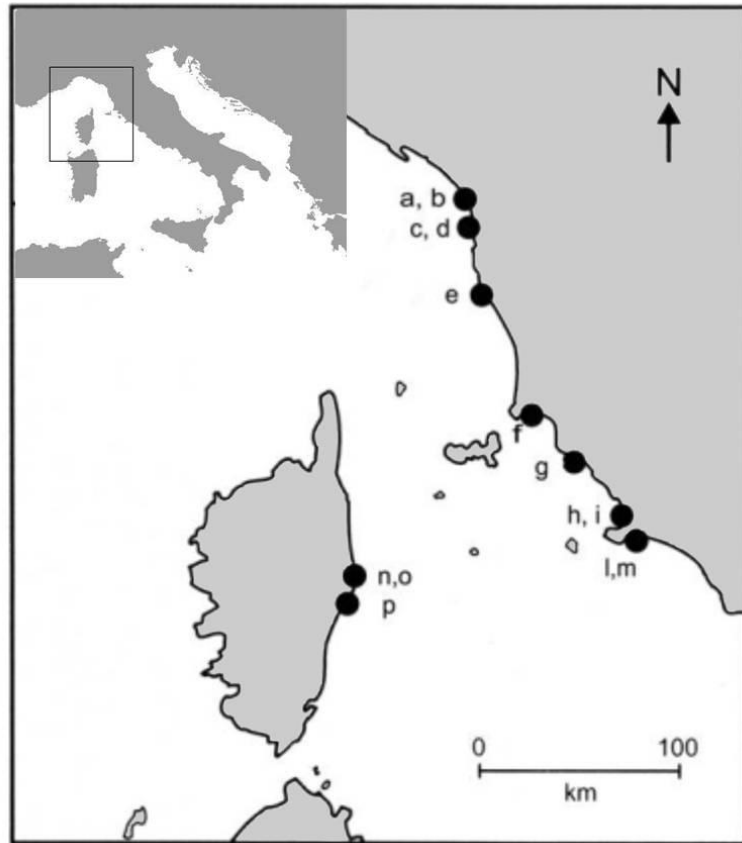


Fig. 1. The map shows the sampling sites.(a) Serchio River mouth, (b) Serchio coastal pond, (c) Batteria vecchia, (d) Morto vecchio River mouth, (e) Rosignano Solvay, (f) Cornia river mouth, (g) Ombrone River mouth, (h) Albegna seashore, (i) Albegna River mouth, (l) Feniglia sandbar near Argentario promontory, (m) Feniglia sandbar near Ansedonia, (n) Aleria, (o) Tavignano, (p) Ghisonaccia.

2.2. Metals analysis

Trace metals content was evaluated according to the procedures previously described by Ugolini et al. (2004, 2005). Samples of sand and sandhoppers were dehydrated at 35° C until they reached a constant weight and then were finely ground. The samples were mineralized in Teflon vessels containing 2 mL of HNO₃ and 0,5 mL of H₂O₂ at 120° C and under pressure

(2.000-3.000 kPa) for 8 h. Analyses of obtained solutions were performed by ICP-OES (Al, Cu, Fe, Mn and Zn), GF-AAS (Cd, Cr and Pb) and CV-AAS (Hg). SRM 1566a "Oyster Tissue" and SRM 1646a "Estuarine Sediment" from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, USA) were used to assess the accuracy. Sample batches differing by more than one standard deviation from the certified value were repeated. Element concentrations (expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight) were determined by the method of standard additions before mineralization. Standard solutions of inorganic elements (Spectrosil grade, BDH) were prepared by serial dilution of stock standard solutions containing 1 g l^{-1} of the element to be determined. Precision, expressed as relative standard deviation from five separate digestions of the same sample, was in the range 5-10%.

2.3. Statistical analysis

Data were logarithmically transformed to ensure the normality of distribution for parametric statistical analysis. Normality of distribution was tested using the Kolmogorov – Smirnov test. The correlation between trace metals concentration in the amphipods tissues and in the sand was evaluated using Pearson's correlation (Zar, 1984).

Moreover, in order to reduce the relatively large number of variables and to assess the discriminatory power of *T. saltator* as biomonitor, the discriminant function analysis was applied (Sokal and Rohlf, 1995; Scott and Clarke, 2000). This multivariate statistical technique, that has been successfully employed in many biomonitoring studies to assess the discriminant power of biomonitors (e.g. Fialkowski and Rainbow, 2006), creates new variables (which are linear function of the original variables) to maximize differences between groups and to reduce variation within groups. In the discriminant function analysis only the accumulated metals, determined on the basis of results of previous analysis (Pearson's correlation), were included in the dataset.

The significance limit for statistical analyses was always set at $p < 0.05$. Linear regression analysis and discriminant function analysis of the concentration data were performed using STATISTICA for Windows, Release 5.0, Copyright StatSoft, Inc. 1984–1995.

3. RESULTS

Metals concentrations in sandhoppers and in the sand for each sampling site are reported in Tab. 1 and Tab. 2 respectively. The results of correlation analysis show a significant positive relationship between content of trace metals in the sandhoppers and in the sand for Hg, Cd, Mn, Al and Fe (Fig. 2). On the contrary, statistical analysis does not show significant correlations in the case of Pb ($p = 0.355$) and Cr ($p = 0.081$) despite a weak positive relation was evident (Fig. 2). For Cu and Zn, although no significant correlation was found, it easy to

note that their concentration in tissues of amphipods was always higher than that one recorded in the sediment (Fig. 2).

Tab. 2. Mean trace metals concentration in sandhoppers (expressed in ppm) \pm SD at each sampling sites. The letters indicate the site reported in Fig. 1.

SITE	ELEMENT								
	Hg	Cd	Pb	Cu	Mn	Cr	Zn	Al	Fe
A	0.15 \pm 0.03	0.51 \pm 0.11	1.55 \pm 0.34	68.86 \pm 10.33	74.38 \pm 10.77	6.24 \pm 1.29	131.90 \pm 10.05	330.9 \pm 6.98	590.8 \pm 29.51
B	0.08 \pm 0.01	0.37 \pm 0.11	0.68 \pm 0.18	52.43 \pm 9.51	151.64 \pm 12.39	4.12 \pm 0.32	112.62 \pm 10.81	479.2 \pm 17.93	488.6 \pm 37.22
C	0.15 \pm 0.04	1.03 \pm 0.30	1.16 \pm 0.24	69.16 \pm 9.04	75.50 \pm 12.55	69.49 \pm 14.0	151.70 \pm 8.36	514.3 \pm 68.15	1248. \pm 116.92
D	0.12 \pm 0.04	0.88 \pm 0.22	0.64 \pm 0.21	62.51 \pm 11.14	61.51 \pm 14.06	19.49 \pm 2.78	122.20 \pm 12.82	525.4 \pm 84.16	672.0 \pm 41.60
E	0.21 \pm 0.06	0.89 \pm 0.19	0.48 \pm 0.08	48.68 \pm 7.32	91.70 \pm 8.18	3.19 \pm 1.18	92.95 \pm 5.24	100.6 \pm 16.19	179.4 \pm 12.96
F	0.07 \pm 0.01	0.48 \pm 0.16	0.66 \pm 0.13	54.86 \pm 2.80	83.36 \pm 20.63	2.61 \pm 0.29	126.12 \pm 10.50	165.1 \pm 37.04	271.0 \pm 26.23
G	0.09 \pm 0.02	0.78 \pm 0.15	0.77 \pm 0.19	51.91 \pm 6.55	90.59 \pm 13.52	12.90 \pm 1.46	87.60 \pm 6.24	756.7 \pm 62.81	1154.2 \pm 48.20
H	0.11 \pm 0.05	1.05 \pm 0.22	0.85 \pm 0.29	36.13 \pm 8.96	206.33 \pm 47.06	3.00 \pm 0.49	93.67 \pm 9.06	776.0 \pm 96.82	2172.0 \pm 284.59
I	0.15 \pm 0.06	0.47 \pm 0.16	0.64 \pm 0.13	62.17 \pm 10.79	148.80 \pm 43.00	3.20 \pm 0.39	82.53 \pm 11.82	592.9 \pm 77.11	1474.7 \pm 166.20
L	0.45 \pm 0.01	0.49 \pm 0.01	0.70 \pm 0.14	60.95 \pm 1.48	94.00 \pm 16.47	1.35 \pm 0.52	134.00 \pm 14.28	539.5 \pm 21.14	1116.0 \pm 81.87
M	0.43 \pm 0.06	0.53 \pm 0.04	0.40 \pm 0.14	58.70 \pm 6.08	75.50 \pm 11.82	1.05 \pm 0.24	120.00 \pm 2.83	486.5 \pm 47.59	800.0 \pm 63.86
N	0.08 \pm 0.03	1.07 \pm 0.19	2.26 \pm 0.78	48.50 \pm 3.32	94.57 \pm 28.11	106.10 \pm 12.8	143.0 \pm 17.13	5201.0 \pm 144.56	2384.81 \pm 379.04
O	0.12 \pm 0.03	0.68 \pm 0.19	1.64 \pm 0.20	38.29 \pm 6.22	59.30 \pm 7.05	12.65 \pm 3.41	110.44 \pm 7.43	2054.3 \pm 63.62	2324.6 \pm 126.83
P	0.09 \pm 0.03	1.01 \pm 0.14	1.10 \pm 0.31	46.11 \pm 2.61	37.56 \pm 7.24	7.40 \pm 1.53	135.78 \pm 6.01	1618.4 \pm 108.15	799.0 \pm 65.30

Tab. 2. Mean trace metals concentration in the sand (expressed in ppm) \pm SD at each sampling sites. The letters indicate the site reported in Fig. 1.

SITE	ELEMENT								
	Hg	Cd	Pb	Cu	Mn	Cr	Zn	Al	Fe
A	0.01 \pm 0.00	0.06 \pm 0.01	8.65 \pm 0.86	2.10 \pm 0.42	696.50 \pm 26.17	194.00 \pm 20.81	33.44 \pm 1.69	7899.8 \pm 491.9	10472.4 \pm 645.5
B	0.02 \pm 0.01	0.11 \pm 0.02	9.35 \pm 0.64	9.03 \pm 1.32	622.55 \pm 62.88	34.62 \pm 6.08	29.59 \pm 2.29	8304.7 \pm 117.5	12496.9 \pm 619.5
C	0.01 \pm 0.00	0.07 \pm 0.03	12.3 \pm 2.26	2.30 \pm 0.47	758.18 \pm 50.37	510.18 \pm 87.66	41.44 \pm 4.36	7189.3 \pm 259.8	11611.2 \pm 331.5
D	0.01 \pm 0.00	0.05 \pm 0.00	8.38 \pm 0.87	6.73 \pm 1.17	629.56 \pm 77.54	47.75 \pm 6.46	19.23 \pm 3.51	6774.0 \pm 628.4	10988.2 \pm 832.9
E	0.05 \pm 0.02	0.24 \pm 0.01	5.93 \pm 0.49	7.18 \pm 1.38	154.07 \pm 22.17	11.07 \pm 2.90	29.18 \pm 1.18	5036.8 \pm 360.6	3162.8 \pm 55.5
F	0.02 \pm 0.00	0.06 \pm 0.01	3.37 \pm 0.67	1.37 \pm 0.55	536.33 \pm 41.86	18.41 \pm 3.39	18.32 \pm 0.59	3234.5 \pm 759.1	4309.0 \pm 354.4
G	0.01 \pm 0.00	0.07 \pm 0.02	9.27 \pm 0.47	7.47 \pm 1.50	845.33 \pm 117.51	58.20 \pm 8.25	42.58 \pm 3.97	9350.6 \pm 906.4	15714.8 \pm 702.5
H	0.06 \pm 0.00	0.16 \pm 0.03	8.43 \pm 1.13	5.2 \pm 0.61	1647.67 \pm 229.8	54.77 \pm 6.19	54.67 \pm 6.74	12126.3 \pm 122.4	17281.0 \pm 398.7
I	0.30 \pm 0.08	0.09 \pm 0.02	7.03 \pm 0.71	6.97 \pm 0.72	1177.53 \pm 92.66	33.77 \pm 9.97	44.27 \pm 4.19	12617.3 \pm 528.8	12548.3 \pm 249.9
L	0.25 \pm 0.06	0.08 \pm 0.01	7.00 \pm 0.28	1.35 \pm 0.07	857.0 \pm 31.11	17.25 \pm 3.30	37.00 \pm 0.00	14436.0 \pm 1028.1	11609.50 \pm 331.6
M	0.21 \pm 0.05	0.20 \pm 0.04	6.47 \pm 0.07	1.10 \pm 0.14	1003.5 \pm 167.6	21.45 \pm 0.64	38.00 \pm 2.83	14247.5 \pm 699.3	11361.0 \pm 944.7
N	0.05 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	8.03 \pm 0.68	8.43 \pm 1.77	277.16 \pm 44.02	41.26 \pm 8.81	39.96 \pm 6.49	15459.3 \pm 786	23328.2 \pm 970.7
O	0.01 \pm 0.00	0.39 \pm 0.05	8.80 \pm 1.29	4.78 \pm 0.86	371.16 \pm 13.60	158.58 \pm 15.26	58.51 \pm 6.02	17400.0 \pm 432.3	19233.9 \pm 351.8
P	0.01 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00	4.77 \pm 0.40	1.23 \pm 0.40	138.12 \pm 29.27	53.92 \pm 5.52	18.83 \pm 2.26	7004.8 \pm 637.7	7077.3 \pm 603.0

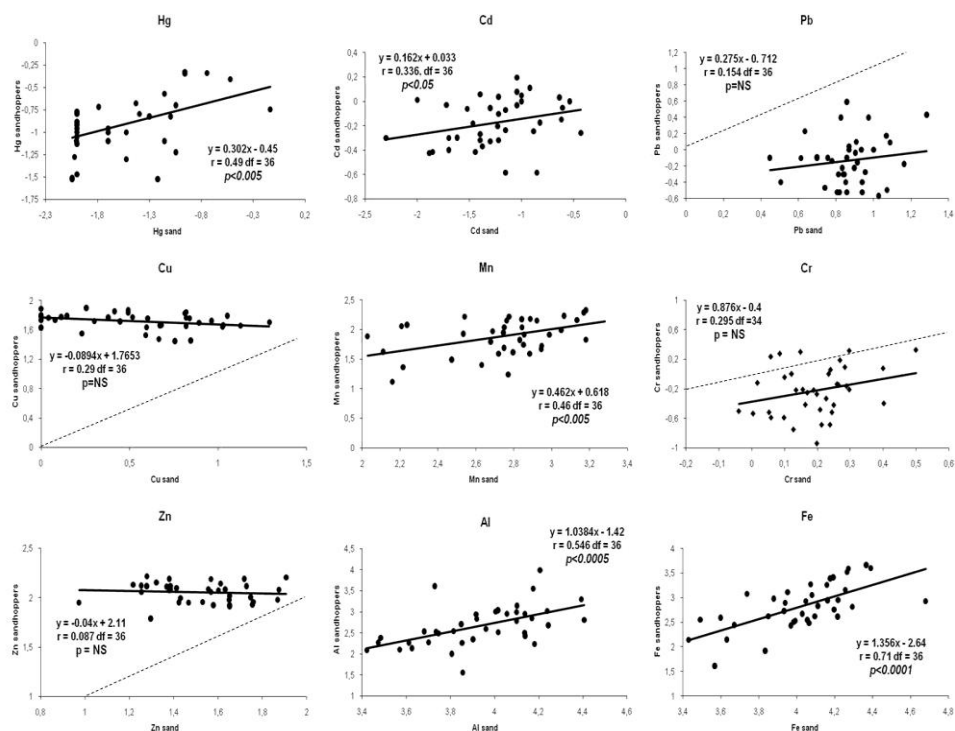


Fig. 2. Relationship between trace metals concentrations in tissues of *T. saltator* and in the sand. For each metal, the equation of the regression line, the correlation coefficient (r), degrees of freedom (df) and probability level (p) are given. For Cu, Zn, Pb and Cr, is also reported the theoretical line (dashed line) that represents the perfect correspondence between concentration in sandhoppers and in the sand.

The results of discriminant analysis show that 78% of total variance is explained by the first two functions (45.9% Function 1, 32.1% Function 2), which eigenvalues amounted to 9.86 and 6.89 respectively (Tab. 3). The discriminant analysis allow the identification of three main groups: (a) Corsican sites (N, O, P, located in the right part of the plot), (b) North and Centre Tuscany sites (A, B, C, D, F situated in the centre – right part of the plot) and (c) South Tuscany sites (G, H, I, L, M, represented by samples on the centre - left part of the plot) (Fig. 3). The site of Rosignano Solvay (E) occupies a distinct position and could not be included in none of the three main clusters (Fig. 3). The first function is dominated by Al, Mn, Zn and Hg (Tab. 3); Fe, Cd, Mn and Hg were the most important variables influencing the second function (Tab. 3).

Tab. 3. Summary of discriminant function analysis of metal concentration data for *T. saltator*. For each discriminant functions the discriminant loadings for each metals and the eigenvalues associated with the roots are also reported.

Variabile	Root 1	Root 2	Root 3	Root 4	Root 5	Root 6
Hg	- 0.74	-0.98	-0.73	-0.5	-0.1	0.02
Cd	- 0.17	-1	-0.22	0.7	-0.18	0.22
Cu	- 0.001	0.61	-0.45	0.67	0.76	-0.15
Al	1.73	0.24	-0.37	0.57	0.58	0.53
Fe	-0.22	-1.1	0.56	-0.84	0.14	-0.8
Mn	-1.07	1.01	0.4	0.41	-0.53	-0.58
Zn	0.9	0.84	0.07	-0.26	-0.61	-0.31
Eigenvalues	9.86	6.89	1.99	1.28	1.02	0.32
Cum. Prop.	0.46	0.78	0.87	0.93	0.98	1

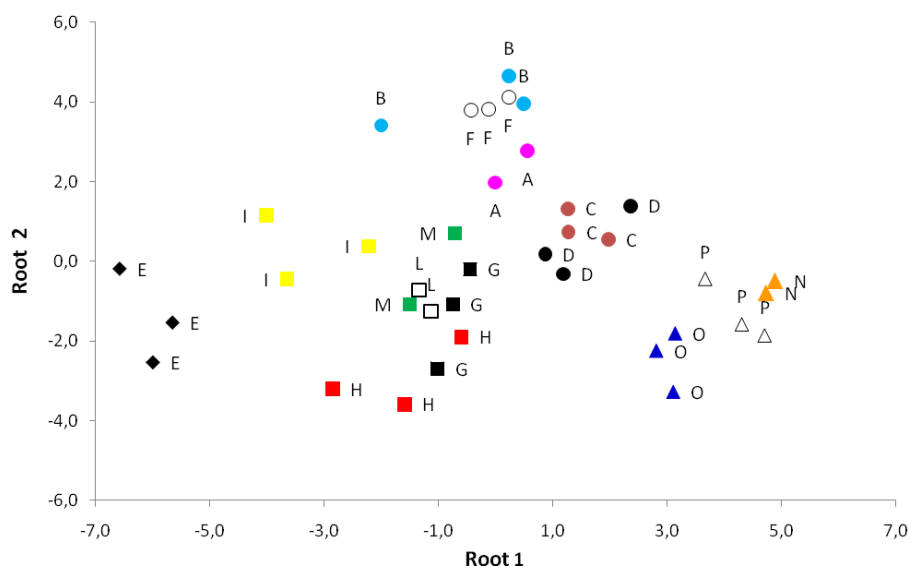


Fig. 3. Two dimensional scatter plot for accumulated metals for each sampling sites. The letters in the figure correspond to those reported in Fig. 1.

4. DISCUSSION

The concentration of Hg, Cd, Fe, Al and Mn in tissues of amphipods follows the concentration recorded in the sand confirming the good ability of *T. saltator* to bioaccumulates these metals. Despite the concentration of Cu and Zn in sandhoppers was not positively correlated to that one measured in the substratum, the amount of these metals was always higher in animals than in the sand. These findings are in agreement with previous studies on *T. saltator* both in Mediterranean and Atlantic European coasts that showed the ability of sandhoppers to accumulate Hg, Cd, Cu, Zn, Fe, Al and Mn (Moore and Rainbow, 1987; Rainbow et al., 1989; 1998; Fialkowski et al., 2000, 2003, 2009; Ugolini et al., 2004, 2005). Furthermore, our results confirm that *T. saltator* does not accumulate Cr and Pb (Ugolini et al., 2004; 2005). However, for Cr, some differences among localities have been found. In fact sandhoppers collected at Batteria vecchia and Aleria showed higher concentration of Cr (69.49 ppm and 106.1 ppm respectively) respect to samples from other sampling sites. This has been previously reported by Ugolini et al. (2004, 2005), who found a Cr concentration in sandhoppers collected at Aleria of 181.5 ppm (Ugolini et al., 2004). The high availability of Cr at Aleria, which origin could be considered natural (see Ugolini et al., 2004 and references therein), is probably a consequence of the input of rivers that arises in an ancient mine area

(Mori et al., 1999). On the contrary, the high concentration of Cr recorded at Batteria vecchia is probably due to the contribution of rivers Serchio and Arno coming from areas characterized by the presence of tanneries and textile factories (Leoni e Sartori, 1996; Dinelli et al., 2005; ARPAT, 2007). However, the high availability of Cr in this site is not only due to the anthropogenic input but also to the natural contribution. In fact, Cr is one of the most important elements that characterizes the mineralogical composition of rocks formation in the basins of these rivers (Dinelli et al., 2005; Cortecchi et al., 2008).

Moreover, discriminant analysis confirms that *T. saltator* can be a selective biomonitor of trace metals pollution of supralittoral band in Mediterranean sandy shores. In fact, the Corsican localities form a separate group showing low levels of trace metals pollution (except for Al) respect to the sampling sites along the Tuscan coast. These data agree with the results of previous researches, employing different organisms such as *Mytilus galloprovincialis* (Andral et al., 2004) *Posidonia oceanica* (Lafabrie et al., 2007; 2008) or sediments (Galgani et al., 2006), that have shown low levels of trace metals contamination along Corsican coastline compared to other Mediterranean coastal areas. The discriminant analysis divided the Tuscan localities into two main cluster based on geographical differences. The first group, constituted by the Tuscan localities located in the North and Centre of the region, is characterized by high availability of Cu and Zn. These sites are characterized by the presence of the mouth of two main river of Tuscany: Arno and Serchio. These rivers, receiving the input of urban (originating from high urbanized cities), industrial (from big metallurgical industry processing Cu, textiles and paper-mills factories) and agricultural discharges (Dinelli et al., 2005; ARPAT, 2007; Cortecchi et al., 2007; 2008), constitute the main source of metals in this part of the region. Instead, the Cornia river mouth sampling site is located near the metallurgic area of Piombino and, how has been previously reported by Leoni e Sartori (1997) in a study carried out on marine sediments, Zn contamination is particularly relevant in this site. However, the values of Cu and Zn observed in our study are lower than that one recorded in highly Cu and Zn contaminated sites in Wales (Dulas Bay) (Rainbow et al., 1989; Fialkowski et al., 2009). In fact the concentrations of Cu and Zn in our samples always fall within the typical range of body concentrations observed in *T. saltator* in other European localities (Fialkowski et al., 2009).

The second group, within the Tuscan localities, identified by discriminant analysis includes the sampling sites of the south part of the region. These localities are differentiated by high presence of Mn and Fe probably of natural origin. In fact, the Argentario Mount (south Tuscany) is characterized by iron-manganese deposits that have been object of extractive activities since many years (Tanelli, 1983). These results agree with the data reported in literature (Ugolini et al., 2004; Fialkowski et al., 2009). The southern localities are also distinguished by high concentration of Hg. This area, indeed, is affected by the presence of cinnabar (HgS) geological anomaly of Mt. Amiata and,

especially, by the Hg mining activities that started in 8th- 1st century B. C. until 1980. These activities gave rise to the levels of Hg in the whole Amiata areas and also in the marine sediments (Barghigiani et al., 1996). Previous researches reported a decrease of Hg contamination from the coast toward the sea, but also from the south to north of the area (Barghigiani et al., 1996). This trend has been observed also in our study. Indeed the concentration recorded in sandhoppers collected in samplings sites along the Feniglia sandbar was higher than that one found in animals from sites near the Albegna river (intermediate concentration) and the Ombrone river mouth (lowest levels among the southern localities).

The results of discriminant analysis show, moreover, that the site of Rosignano Solvay is outside of the main groups. In fact, sandhoppers from this locality show generally low levels of Cu, Zn, Al and Fe but quite high levels of Hg. The high availability of Hg at Rosignano Solvay has also been reported in many studies using *P. oceanica* (Ferrara et al., 1987; 1993; Balestri et al., 2004; Lafabrie et al., 2007), *M. galloprovincialis* or marine sediment (ARPAT, 2007). The presence of chlor - alkali plant at this locality, which uses liquid mercury in electrolytic cells to produce chlorine and sodium hydroxide, is the main cause to determine high Hg availability (Ferrara et al., 1993; ARPAT, 2007). In fact, this plant discharged directly into the close area large amount of Hg, not only through the effluents (12-14 t every year from 1950 to 1973) (Ferrara et al., 1989) but also via gaseous emissions (54 g for hour during the summer) (Grönlund et al., 2005).

A comparison of our results with the data previously reported for the same sampling sites by Ugolini et al. (2004) show some temporal differences (Tab. 4). In particular most part of values observed in our study are lower than that one reported by Ugolini et al. (2004). Cd and Zn concentrations in sandhoppers collected in all the sampling sites showed lower values than that one recorded in 1999-2000 (Ugolini et al., 2004) (Tab. 4). For instance, in the case of Cd our values are lower than 50-70% respect to data reported by Ugolini et al. (2004). For Cu the values observed in our study are of the same magnitude showed by previous research (Ugolini et al., 2004) except for Albegna seashore samples that showed lower concentration (36.13 ppm respect to 65.2 ppm) (Tab. 3). Also for Hg our data reveal a general decrease of concentration of this metal for almost all sampling sites (Tab.4).

In conclusion this study confirm the relevance of the use of *T. saltator* as biomonitor of trace metals contamination of the supralittoral environment. Furthermore, our results demonstrate that this species could be successfully employed to identify hot spot of trace metals contamination and could be used not only on wide geographical scale (Fialkowski et al., 2009) but also on a narrow scale.

Tab. 3. Comparison of Cu, Cd, Hg and Zn concentration in sandhoppers recorded in the present study (PS) with that one reported by Ugolini et al., (2004) (Ug). The data referred to six sampling sites of Tuscan and Corsican coast (for further information see also Fig. 1).

Sampling sites	Cu		Cd		Hg		Zn	
	PS	Ug	PS	Ug	PS	Ug	PS	Ug
Serchio River mouth	68.86	64	0.51	0.96	0.15	0.21	131.9	134
Rosignano Solvay	48.68	47	0.89	3.88	0.21	0.2	92.95	146.5
Ombrone River	51.91	54.3	0.78	1.04	0.09	0.198	87.60	156
Albegna River	62.17	63.4	47	0.82	0.15	0.203	82.53	112
Albegna seashore	36.13	65.2	1.05	1.3	0.11	0.23	93.67	155
Aleria	48.5	54.7	1.07	3.32	0.08	0.12	143.0	187

5. REFERENCES

- Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F. & Boissery, P. 2004. Monitoring chemical contamination levels in Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Pollution Bulletin*, **49**, 704-712.
- ARPAT, 2007. Programma di monitoraggio dell'ambiente marino costiero della toscana attività luglio 2006 - gennaio 2007.
- Balestri, E., Benedetti - Cecchi, L. & Lardicci, C. 2004. Variability in patterns of growth and morphology of *Posidonia oceanica* exposed to urban and industrial wastes: contrasts with two reference locations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **308**, 1-21.
- Barghigiani, C., Ristori, T. & Lopez Arenas, J. 1996. Mercury in marine sediments from a contaminated area of the northern Tyrrhenian sea: <20 µm grain-size fraction and total sample analysis. *Science of the Total Environment*, **192**, 63-73.
- Bergerard, J. 1989. Ecologie des laisses de marée. *Année Biologique* **28**, 39-54.
- Brown, A.C. & McLachlan, A. 1994. *Ecology of Sandy Shores*. Elsevier, Amsterdam.
- Cortecchi, G., Dinelli, E. & Boschetti, T. 2007. The River Arno catchment, northern Tuscany: chemistry of waters and sediments from the River Elsa and River Era sub-basins, and sulphur and oxygen isotopes of aqueous sulphate. *Hydrological Processes*, **21**, 1-20.
- Cortecchi, G., Dinelli, E., Boschetti, T., Arbizzani, P., Pompilio, L. & Mussi, M. 2008. The Serchio River catchment, northern Tuscany: Geochemistry of stream waters and sediments, and isotopic composition of dissolved sulfate. *Applied Geochemistry*, **23**, 1513-1543.
- Defeo, O. & McLachlan, A. 2005. Patterns, processes and regulatory mechanisms in sandy beach macrofauna: a multi-scale analysis. *Marine Ecology Progress Series*, **295**, 1-20.
- Defeo, O., McLachlan, A., Schoeman, D.S., Schlacher, T.A., Dugan, J., Jones, A., Lastra, M. & Scapini, F. 2009. Threats to sandy beach ecosystems: A review. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **81**, 1-12.
- Dinelli, E., Cortecchi, G., Lucchini, F. & Zantedeschi, E. 2005. Sources of major and trace elements in the stream sediments of the Arno River catchment (northern Tuscany, Italy). *Geochemical Journal*, **39**, 531-545.
- Ferrara, R., Maserti, E. & Paterno, P. 1989. Mercury distribution in maritime sediments and its correlation with the *Posidonia oceanica* prairie in a coastal area affected by a chlor-alkali complex. *Toxicology and Environmental Chemistry*, **22**, 131- 134.
- Ferrara, R., Maserti, E., Morelli, E., Morelli, M., Nannicini, L., Scarano, G., Seritti, A. & Torti, M. 1993. Metalli pesanti nelle acque e nella

- Posidonia oceanica* nell'arcipelago toscano. In: *Progetto Mare: Ricerca sullo stato biologico chimico e fisico dell'alto Tirreno toscano*, pp. 45-55.
- Fialkowski, W. & Rainbow, P.S.** 2006. The discriminatory power of two biomonitors of trace metals bioavailabilities in freshwater streams. *Water Research*, **40**, 1805-1810.
- Fialkowski, W., Calosi, P., Dahlke, S., Dietrich, A., Moore, P.G., Olenin, S., Persson, L.E., Smith, B.D., Špegys, M. & Rainbow, P.S.** 2009. The sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda) as biomonitor of trace metals bioavailability in European coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, **58**, 39-44.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Fialkowska, E. & Smith, B.D.** 2000. Biomonitoring of trace metals along the Baltic Coast of Poland using the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea: Amphipoda). *Ophelia*, **52**, 183-192.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Smith, B.D. & Zmudzinski, L.** 2003. Seasonal variation in trace metal concentrations in three talitrid amphipods from the Gulf of Gdansk, Poland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **288**, 81-93.
- Galgani, F., Chiffoleau, J.F., Orsoni, V., Costantini, L., Boissery, P., Calendini, S. & Andral, B.** 2006. Chemical contamination and sediment toxicity along the coast of Corsica. *Chemistry and Ecology*, **22**, 299-312.
- Griffiths, C.L., Stenton - Dozey, J.M.E. & Koop, K.** 1983. Kelp wrack and the flow of energy through a sandy beach ecosystem. In: *Sandy beaches as ecosystems* (Ed. by A. McLachlan & T. Erasmus), pp. 547-556, Junk Publ., The Hague.
- Grönlund, R., Sjöholm, M., Weibring, P., Edner, H. & Svanberg, S.** 2005. Elemental mercury emission from chlor – alkali plants measured by lidar techniques. *Atmospheric Environment*, **39**, 7474-7480.
- Ikem, A. & Egiebor, N.O.** 2005. Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**, 771-787.
- Islam, M.S. & Tanaka, M.** 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 624-649.
- Lafabrie, C., Pergent, G., Kantin, R., Pergent- Martini, C. & Gonzalez, J.-L.** 2007. Trace metals assessment in water, sediment, mussel and seagrass species – Validation of the use of *Posidonia oceanica* as a metal biomonitor. *Chemosphere*, **68**, 2033-2039.
- Lafabrie, C., Pergent- Martini, C. & Pergent, G.** 2008. Metal contamination of *Posidonia oceanica* meadows along the Corsican coastline (Mediterranean). *Environmental Pollution*, **151**, 262-268.

- Leoni, L. & Sartori, F.** 1996. Heavy metals and arsenic in sediments from the continental shelf the Northern Tyrrhenian/Eastern Ligurian Seas. *Marine Environmental Research*, **41**, 73-98.
- Leoni, L. & Sartori, F.** 1997. Heavy metals and arsenic distributions in sediments of the Elba – Argentario basin, southern Tuscany, Italy. *Environmental Geology*, **32**, 83-92.
- Luoma, S.N. & Rainbow, P.S.** 2008. *Metal contamination in aquatic environments: Science and lateral management*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Mardsen, I.D. & Rainbow, P.S.** 2004. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology - the amphipod example? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **300**, 373-408.
- Moore, P.G. & Rainbow, P.S.** 1987. Copper and zinc in an ecological series of talitroidean Amphipoda (Crustacea). *Oecologia*, **73**, 120-126.
- Mori, C., Orsini, A. & Migon, C.** 1999. Impact of arsenic and antimony contamination on benthic invertebrates in a minor Corsican river. *Hydrobiologia*, **392**, 73-80.
- Rainbow, P.S.** 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, **31**, 183-192.
- Rainbow, P.S.** 2006. Biomonitoring of trace metals in estuarine and marine environments. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, **12**, 107-122.
- Rainbow, P.S. & Phillips, D.J.H.** 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*, **26**, 593-601.
- Rainbow, P.S., Fialkowski, W. & Smith, B.D.** 1998. The sandhopper *Talitrus saltator* as a trace metal biomonitor in the Gulf of Gdansk, Poland. *Marine Pollution Bulletin*, **36**, 193-200.
- Rainbow, P.S., Moore, P.G. & Watson, D.** 1989. Talitrid amphipods (Crustacea) as biomonitors for copper and zinc. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **28**, 567-582.
- Schlacher, T.A., Dugan, J., Schoeman, D.S., Lastra, M., Jones, A., Scapini, F., McLachlan, A. & Defeo, O.** 2007. Sandy beaches at the brink. *Diversity and Distribution*, **13**, 556-560.
- Scott, A. & Clarke, R.** 2000. Multivariate techniques. In: *Statistics in Ecotoxicology* (Ed T. Sparks). Wiley, Chichester, UK.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J.** 1995. *Biometry*, 3rd edition. W.H. Freeman and Company, New York.
- Tanelli, G.** 1983. Mineralizzazioni metallifere e minerogenesi della Toscana. *Atti delle Giornate di studi geologici sulla Toscana: Bernardino Lotti. Mem. Soc. Geol. Ital.*, **25**, 91-109.
- Ugolini, A., Borghini, F., Calosi, P., Bazzicalupo, M., Chelazzi, G. & Focardi, S.** 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 526-532.

Ugolini, A., Borghini, F., Focardi, S. & Chelazzi, G. 2005. Heavy metals accumulation in two syntopic sandhopper species: *Talitrus saltator* (Montagu) and *Talorchestia ugolinii* (Bellan Santini and Ruffo). *Marine Pollution Bulletin*, **50**, 1328-1334.

CAPITOLO 3

Metallothionein induction in the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda).

Questo capitolo è stato redatto sulla base di un articolo inviato per la pubblicazione nel dicembre 2009 alla rivista Chemosphere, G. Ungherese, D. Baroni, P. Bruni, A. Ugolini, “ Metallothionein induction in the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda”.

ABSTRACT

We investigated the role of metallothioneins (MTs) in detoxification processes in the talitrid amphipod *Talitrus saltator*, an established biomonitor of trace metals contamination in the supralittoral environment. Sandhoppers were exposed in the laboratory to different concentration of Hg, Cd or Cu for 3 h, 6 h, 24 h and 48 h. Analyses were also carried out on sandhoppers collected in the wild from six localities along the Tuscan coast with different degrees of trace metals contamination. Animals exposed in laboratory to Hg showed a strong dose-dependent increase of MT levels after 3 h and 6 h; in the following hours (24h and 48h), the MT concentrations reached control levels, possibly due to a general toxic effect of Hg. For the other metals, the MT concentrations were higher than controls in animals exposed to 10 ppm of Cd and 5 ppm and 10 ppm of Cu. The fast induction of MTs shown by *T. saltator* suggests an important role of these proteins as a first mechanism of detoxification in response to excessive levels of trace metals. Therefore, despite the positive correlation between MT concentrations and trace metals in sandhoppers collected in the wild, the fast MTs response observed in laboratory suggests a not appropriate use of MT as biomarkers to assess trace metals pollution in coastal areas.

Keywords: Amphipods; supralittoral, biomarkers; trace metals; sandy beaches.

1. INTRODUCTION

Crustaceans have a variety of regulatory mechanisms that reduce the concentration of potentially toxic metals. These include physiological mechanisms to balance the excretion/uptake rates (Rainbow, 2002), sequestration systems involving specific vacuoles that produce metal-rich insoluble granules (Viarengo, 1989; Weeks, 1992; Viarengo and Nott, 1993), and high-affinity proteins known as metallothioneins (MTs) (Roesijadi, 1992; Viarengo and Nott, 1993; Amiard et al., 2006). Given their high affinity to metal cations, MTs play an important role in the homeostasis of essential metals (Cu and Zn), acting as a reservoir ready to fulfill the metabolic and enzymatic demands, and they are also involved in detoxification of non-essential metals (Hg, Cd, and Ag) in many organisms. Since the synthesis of MTs is enhanced by heavy metals, they have been widely used as specific biomarker to detect an organism's exposure to Cu, Hg, Cd, Ag and Zn. Despite the extensive use of MTs as biomarkers in invertebrates and vertebrates, studies have shown differing results and inconsistencies that have led to discordant conclusions (see Amiard et al., 2006 and references therein). For example, many environmental and physiological factors unrelated to metal contamination can interfere with MT synthesis, such as starvation, handling, anoxia, sex, weight, molt stage (mainly in crustaceans), season and salinity (Amiard et al., 2006).

Many species of littoral amphipods have been used as biomonitors of trace metal bioavailability in coastal waters (see Marsden and Rainbow, 2004 for a review). In particular, the supralittoral amphipod *Talitrus saltator* accumulates Cu, Cd, Zn, Hg, Mn, Al and Fe (Rainbow et al., 1998; Fialkowski et al., 2000, 2003, 2009; Ugolini et al., 2004, 2005, 2008). Moreover, amphipods can survive in heavily polluted sites with a high availability of metals (Rainbow et al., 1989; Ugolini et al., 2004). The high tolerance to pollutants shown by talitrid amphipods could be due to reduction of metal uptake or the presence of detoxification mechanisms. However, specimens of the talitrid amphipod *Orchestia gammarellus* collected from sites with different degrees of metal contamination in France and the UK did not show differences in trace metal uptake rates (Rainbow et al., 1999). Studies using *O. gammarellus* have shown that MTs play a role in the detoxification process (delivering the excess of Cu and Zn to lysosomes in the ventral caeca) (Nassiri et al., 2000). However, after 5-25 days of laboratory exposure to Cu, Zn, and Cd, there was no significant increase of MT concentrations (Mouneyrac et al., 2002). Similar results have been reported in the amphipod *T. saltator* exposed in laboratory to different concentration of Cu for 3-5 days (Ungherese et al., 2007). Instead, the freshwater amphipod *Echinogammarus echinosetosus* showed a dose-dependent MT induction after 24 h of exposure to Cd (Martinez et al., 1996). Therefore, as reported for many invertebrates (Amiard et al., 2006), the exposure time also affects MT induction in amphipods. Moreover, in these

species a significant decrease of MT concentration has been reported in animals exposed to the highest dose of Cu (*O. gammarellus*, Mouneyrac et al., 2002) and Hg (*E. echinosetosus*, Martinez et al., 1996), perhaps due to a general toxic effect of the metal.

In this study, we examined the induction of MTs in *T. saltator* specimens exposed to essential and non-essential metals (Cu, Cd and Hg) in order to clarify the role of MTs in metal detoxification in talitrid amphipods.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Sandhopper sampling and experimental exposure

Adult individuals of *T. saltator* were collected in summer (June - July) 2007 - 2008 on the sandy beach of Fiume Morto Vecchio (Regional Natural Park of Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli, Pisa, northern Tuscany, Italy) and were tested not more than 15 days later. After collection, the sandhoppers were transported to the laboratory and kept in plastic containers with wet sand. They were fed twice a week with dry fish food (SERA bioflakes; Sera, Germany) and blotting paper and subjected to an artificial light cycle corresponding in phase and duration to the natural one. The day before the tests, the sandhoppers were transferred to a thermostatically controlled room ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) where the experiments were performed.

To ensure experimental conditions easy to reproduce (see also Mouneyrac et al. 2002), we decided to carry out all the trials in aerated artificial seawater at 33‰ salinity. In fact, despite talitrid amphipods are semi-terrestrial crustaceans, spending much time out of water in the damp belt of the beach, *T. saltator* cope very well with immersion in seawater (Ugolini et al., 1995, Rainbow et al., 1999; Nassiri et al., 2000). The solutions were prepared 24 h before each test as a solution of artificial sea salt (Tropic Marin[®] Sea Salt, Wartenberg, Germany) diluted in double distilled water using a magnetic stirrer. The saline concentration was checked before and after the tests with a hand refractometer (Sper Scientific 106 ATC salt refractometer, Scottsdale, Arizona). Metal solutions were prepared by serial dilution from a stock solution of each toxicant (HgCl_2 , CuCl_2 and CdCl_2). Control amphipods were kept in artificial seawater.

The metals used are well-known MT inducers in many invertebrates (Roesijadi, 1992; Amiard et al., 2006) and show different degrees of toxicity for *T. saltator*: $\text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd}$ (Ungherese and Ugolini, 2009). The MT concentrations were assessed in groups of sandhoppers exposed for 3 h, 6 h, 24 h and 48 h to 0.01 and 0.05 ppm of Hg, 1, 5 and 10 ppm of Cu and Cd, and controls. For each experimental condition, controls and contaminated amphipods were sampled, rinsed in distilled water and stored at -80°C . The metal and MT concentrations were also determined in sandhoppers before the beginning of the tests (0 h).

Since size can influence the amount of accumulated metals (Rainbow and Moore, 1986; Moore and Rainbow, 1987) and MT concentrations (Geffard et al., 2007) in amphipods, only adult individuals of similar weight (0.015 - 0.02 g) were used in the trials. The animals were not fed during the test and dead sandhoppers (when present) were removed daily and not used in the following analysis. Three replicates (with 5 – 7 animals) were carried out for each experimental condition. For each exposure time, we also determined the Cu, Cd and Hg contents in sandhopper tissue (7-10 animals).

The MT and trace metal contents were also quantified in samples of amphipods collected directly in the wild in May 2007 from six locations along the Tuscan coast (Albegna River mouth, Albegna seashore, Cornia River mouth, Piombino, Albegna coastal pond, Rosignano Solvay) with different degrees of trace metals contamination (see Ugolini et al., 2004). After collection, the sandhoppers were transported to the laboratory in cool boxes (within few hours) and immediately frozen.

2.2. Quantification of MTs

The concentration of MTs in dry sandhopper tissue homogenates was assayed colorimetrically using the Micro MT *spec* kit (Ikzus Environment[®], Genoa, Italy). The assay is based on the chemical determination of cysteine residues by Ellman's reaction (Viarengo et al., 1997). Endogenous thiols (such as glutathione, free cysteine, etc.) do not interfere with the assay. The homogenates (sandhopper tissue with the addition of homogenizing buffer) were centrifuged at 30,000 x g for 20 min at 4°C. After a supernatant was obtained, MTs were precipitated with alcohol (absolute ethanol), incubated at -20°C for 60 min and then centrifuged at 16,000 x g for 5 min at 4°C. The precipitated MT sample was resuspended in denaturing buffer and chemically reacted with Ellman's reagent Bis (3-carboxy-4-nitrophenyl) disulfide. The absorption was read at 412 nm and a solution of reduced glutathione was used as reference standard. To obtain the concentration of MTs (nmol MTs) per gram of tissue, the following formula was applied:

$$\text{nmol MT} \times \text{g}^{-1} \text{ dry weight} = \text{nmol Cys}^{\text{MT}} / 0.1 \text{ g} \times n^{\text{cys}}$$

in which 0.1 g is the amount of tissue equivalent to 0.3 ml of supernatant subjected to precipitation; n^{cys} is the number of cysteine residues present in crustacean MT; $\text{nmol Cys}^{\text{MT}}$ is the concentration of sulfhydryl groups, i.e. cysteine residues, due to MTs present in the sample.

2.3. Quantification of metals

Sandhoppers were killed by freezing, dehydrated at 35°C until constant weight and then finely ground. The samples were mineralized in Teflon vessels containing 2 mL of HNO₃ and 0.5 mL of H₂O₂ at 120°C and under pressure (2.000-3.000 kPa) for 8 h. After digestion, the solution was brought to a volume of 10 mL by addition of deionized water. During each mineralization, we performed several “blank trials” (putting only the reagents in the Teflon

containers) to verify the absence of contamination. Analyses of the resulting solutions were performed by ICP-OES (Cu), GF-AAS (Cd) and CV-AAS (Hg). SRM 1566a "Oyster Tissue" from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, USA) was used to assess the accuracy of the analytical procedures. For samples collected directly in the wild, trace metals analysis was extended to Zn, Mn, Fe and Al (ICP-OES), Cr and Pb (GF-AAS). The results of the determination were only accepted if the values measured for the SRMs were within the certified concentration range; if not, we repeated the analyses. The element concentrations (expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$) were calculated by the method of "internal additions". The coefficients of variation for the various elements were between 5% and 10%.

2.4. Statistical analysis

Since the metals analysis was performed in one group of amphipods for experimental condition in animals tested in laboratory, no statistics were carried out. Differences between MT concentrations recorded for each metal at each exposure time were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) while post-hoc comparisons were carried out with the Tukey test. Null hypotheses were rejected at the 95% significance level ($p < 0.05$).

The metal contents recorded in sandhoppers from the different localities along the Tuscan coast were used to calculate the metal pollution index (MPI, see Usero et al., 1997):

$$\text{MPI} = (\text{Cf}_1 \times \text{Cf}_2 \times \text{Cf}_3 \times \dots \times \text{Cf}_n)^{1/n}$$

where Cf_i is the concentration for metal i in the sample. As previously reported in many researches for different biomonitors (Usero et al., 2005; Lafabrie et al., 2008), we used the MPI to compare metal pollution at different sampling sites. The correlation between MTs concentration and MPI was assessed using the Spearman rank-order correlation coefficient test (Siegel and Castellan, 1989).

3. RESULTS

A comparison of the concentrations of MTs recorded in control sandhoppers after 0 h, 3 h, 6 h, 24 h and 48 h of exposure to uncontaminated seawater does not show significant differences ($F = 2.47$, $df = 4$, $p = \text{N.S.}$, ANOVA) (Fig. 1). The minimum and maximum MT contents were recorded respectively after 3 h ($6.67 \text{ nMol MT g}^{-1} \text{ dry weight (dw)}$) and 6 h ($14.81 \text{ nMol MT g}^{-1} \text{ dw}$) of exposure, while at 0 h the MTs concentration was $9.94 \text{ nMol MT g}^{-1} \text{ dw}$ (datum not shown in the figure). Furthermore, the Cu, Hg and Cd contents in control amphipods do not show marked differences between the times of exposure and they are lower than those in sandhoppers exposed to contaminated sea water for the same time (Fig. 1). For all metals and for almost each exposure time, the metal concentration in the amphipods reflects the Hg, Cd or Cu exposure concentration (Fig. 1).

In specimens exposed to Hg, Cd and Cu, there is a rapid induction of MTs in the first hours of test (3h and 6 h) (Fig. 1). In fact, after 3 h and 6 h of exposure to 0.01 and 0.05 ppm of Hg, the MT values in contaminated sandhoppers are clearly dose-dependent even though statistical significance is only reached after 3 h ($F = 26.97$, $df = 2$, $p < 0.01$ at 3 h; $F = 1.12$, $df = 2$, $p = \text{N.S.}$ at 6 h, ANOVA). For the other exposure times, the MTs contents in the sandhoppers are generally equal to, or even lower than, those observed in uncontaminated sandhoppers for the same exposure time ($F = 0.42$ at max, $df = 2$, $p = \text{N.S.}$ at 24 h and 48 h).

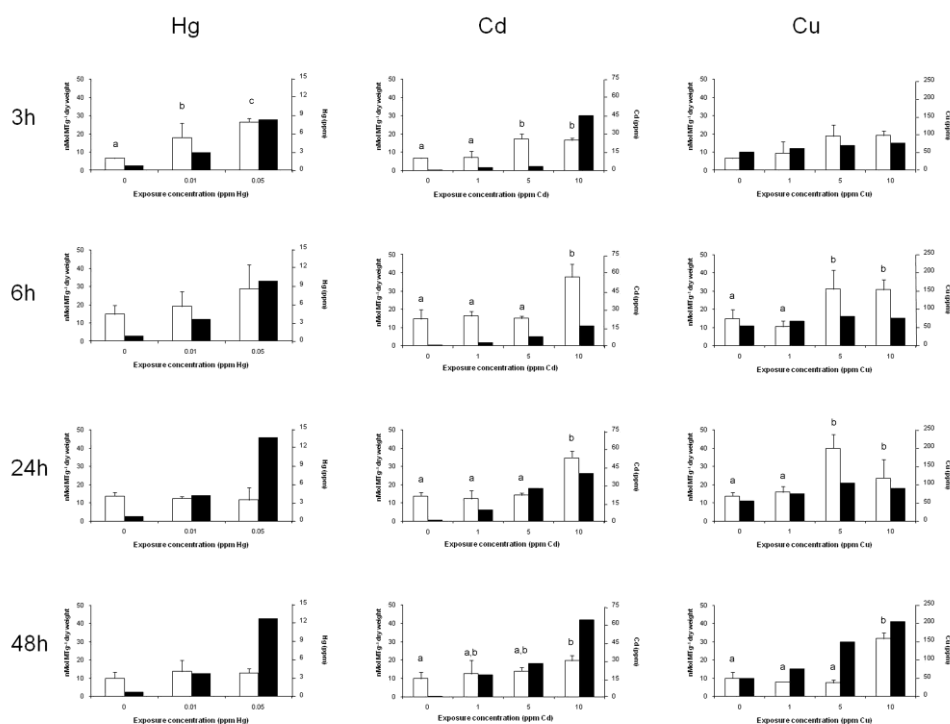


Fig. 1. MTs concentration (nMol MT g⁻¹ dw) (white bars) and Hg, Cd or Cu concentration (ppm) (black bars) in *T. saltator* exposed to different concentrations of Hg, Cd and Cu for 3 h, 6 h, 24 h and 48 h. MTs concentrations are reported as mean \pm S.D. Values of MTs sharing the same letters are not significantly different ($p > 0.05$, Tukey test).

Compared with controls, MTs increase markedly in groups exposed to 10 ppm of Cd for each exposure time, although the value at 48 h is lower than that at earlier times but still double that of unexposed sandhoppers (Fig. 1). After 3 h of exposure to 5 ppm of Cd, the amphipods show a significant induction of MTs (triple that of controls), with a concentration similar to that in animals exposed to the highest dose. Beyond 3 h, the MTs content in these animals decreases, reaching the levels observed in controls. At the lowest dose of Cd, the MT concentration is comparable to that recorded in uncontaminated amphipods (Fig. 1). In the Cd tests, ANOVA shows significant differences for each time of exposure ($F = 25.97$, $df = 3$, $p < 0.01$ at 3 h; $F = 36.16$, $df = 3$, $p < 0.01$ at 6 h; $F = 66.81$, $df = 3$, $p < 0.01$ at 24 h; $F = 5.33$, $df = 3$, $p < 0.05$ at 48 h, ANOVA).

During the exposure of *T. saltator* to Cu, the MT content increases until 24 h in groups exposed to 5 ppm and throughout the duration of the experiment in amphipods exposed to 10 ppm (Fig. 1). As with the lowest Cd concentration, the MT contents in sandhoppers exposed to 1 ppm of Cu are always similar to controls (Fig. 1). Furthermore, ANOVA shows a significant difference at each exposure time except 3 h ($F = 2.83$, $df = 3$, $p = \text{N.S.}$ at 3 h; $F = 15.8$, $df = 3$, $p < 0.01$ at 6 h; $F = 8.53$, $df = 3$, $p < 0.05$ at 24 h; $F = 128.4$, $df = 3$, $p < 0.01$ at 48 h, ANOVA).

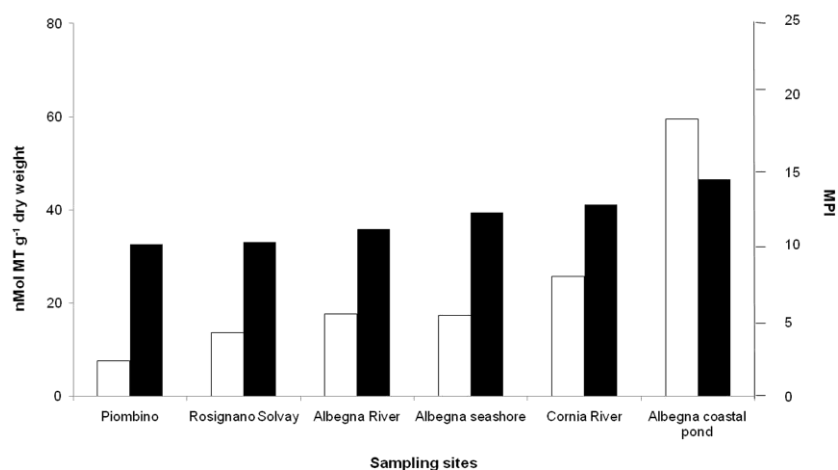


Fig. 2. MTs concentration (nMol MT g⁻¹ dw) (white bars) and MPI (Metal Pollution Index) (black bars) in *T. saltator* from different sites along the Tuscan coast. The sampling sites are ordered according to the MPI values.

The MT contents recorded in amphipods collected directly in the wild are positively correlated to the pollution index (MPI) ($r_s = 0.943$, $n = 6$, $p = 0.02$, Spearman rank-order correlation coefficient test) (Fig. 2) (Table 1).

Tab. 1. Trace metals concentration (ppm dry weight) in sandhoppers collected directly in the wild.

Sampling site	Element								
	Cu	Cd	Hg	Zn	Al	Fe	Cr	Pb	Mn
Piombino	37.4	0.33	0.12	103	71.2	372	5.5	0.58	78.9
Rosignano Solvay	33.2	0.64	0.17	63.9	127.2	363	2.2	1.19	47.7
Albegna seashore	39.6	0.71	0.16	87.3	86.8	481	2.7	0.30	211
Albegna River	69.7	0.26	0.08	61.1	241.8	954	4.0	0.73	108.4
Cornia River	47.8	0.44	0.06	85.1	123.6	542	9.0	0.82	181.5
Albegna coastal pond	48.4	0.14	0.04	60.1	337.2	1762	7.8	1.67	232.5

4. DISCUSSION

MTs have been proposed as biomarkers of trace metals exposure in many vertebrates and invertebrates and are routinely used in environmental monitoring programs (e.g. see Viarengo et al., 1999; Amiard et al., 2006; Bowen and Depledge, 2006). However, little is known about the role played by these proteins in talitrid amphipods, well-known biomonitors of trace metals contamination of the supralittoral environment (see Marsden and Rainbow, 2004). Previous studies on the talitrid amphipods *O. gammarellus* (Mouneyrac et al., 2002) and *T. saltator* (Ungherese et al., 2007) did not show any significant increase of MTs in specimens exposed, respectively, to Cu, Zn and Cd for 5-25 days and to Cu for 3-5 days. In contrast, our data show that Hg, Cd and Cu induced a significant dose-dependent rise in the MTs concentration in sandhoppers exposed for a short time. Moreover, for each metal, a qualitative evaluation reveals that the trace metal uptake in *T. saltator* depends on the metal concentration in seawater and less clearly on the time of exposure. The different degree of induction for different metals in sandhoppers agrees with the data reported by Ungherese and Ugolini (2009) regarding LC₅₀. For *T. saltator*, Hg was the most toxic metal followed by Cu and Cd (Ungherese and Ugolini, 2009). A similar dose-dependent response was recorded in the freshwater amphipod *E. echinosetosus* exposed to a range of Cd concentrations (0.1-1

ppm) for 24 h and 48 h (Martinez et al., 1996). The fast induction of MTs in *T. saltator* has also been reported in many crustacean species, e.g. in the copepod *Tigriopus brevicornis* (Barka et al., 2001) after 1 day of exposure to a range of doses of Cu, Hg, Cd, Ag, Ni or Zn, in the cladoceran *Daphnia magna* after 2 h of exposure to Cd (Bodar et al., 1998), and in the crayfish *Procambarus clarkii* and the phyllopodan *Artemia* sp. after 12 h of exposure to 10 ppm of Cd (Marinez et al., 1993; Del Ramo et al., 1995).

After 24 and 48 h of exposure to both concentrations of Hg, the concentration of MTs in sandhoppers reached the levels observed in control animals. This was probably due to a general toxic effect of Hg on the metabolism of *T. saltator*, preventing full functionality of the detoxification process. In fact, studies have reported a reduction of the MTs concentration at the highest tested dose of Hg in *T. brevicornis* (Barka et al., 2001), as well as in *O. gammarellus* (Mouneyrac et al., 2002) and *E. echinosetosus* (Martinez et al., 1996) exposed to Cu and Cd, respectively.

Regarding the data for sandhoppers collected directly in the wild, as previously shown by Mouneyrac et al. (2002) for *O. gammarellus*, the concentration of MTs was higher in *T. saltator* from sites with a high availability of trace metals, even though the values of MPI for some sampling sites showed little difference.

5 CONCLUSIONS

Although talitrid amphipods are well-established biomonitors of trace metals contamination of coastal areas, only a few studies have investigated the importance of detoxification mechanisms in these species (Nassiri et al., 2000; Mouneyrac et al., 2002; Ungherese et al., 2007). In contrast to previous research (Mouneyrac et al., 2002; Ungherese et al., 2007), our laboratory results show induction of MTs in *T. saltator* in response to trace metals exposure. Furthermore, our research clearly shows the importance of the time of exposure to trace metals on MT induction in sandhoppers. In fact, animals exposed for a short time to Hg, Cd and Cu exhibited an increased MT concentration. The very fast induction of MTs showed by *T. saltator* suggests that these proteins play an important role as a first mechanism of detoxification in response to excessive levels of trace metals. Therefore, although MTs concentration in samples collected in the wild varies according to trace metals contamination, the fast MTs response observed in laboratory suggests an unsuitable use of sandhoppers' MT as biomarkers of heavy metals contamination of supralittoral environment.

Acknowledgements

The research was financially supported by the Fondazione Monte dei Paschi (Siena) (grants 31017 and 33798 assigned to A. Ugolini). Thanks are due to the Ente Parco Regionale di Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli (Pisa)

for authorization of the sampling. We also wish to thank Dr. Diego Bonomo for his technical assistance during the laboratory analysis.

6 REFERENCES

- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J. & Rainbow, P.S.** 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, **76**, 160-202.
- Barka, S., Pavillon, J.-F. & Amiard, J.C.** 2001. Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the Copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **128**, 479-493.
- Bodar, C.M.W., Kluytmans, J.H., Van Montfort, J.C.P., Voogt, P.A. & Zandee, D.I.** 1998. Cadmium resistance and the synthesis of metallothionein-like proteins in *Daphnia magna*. In: *Proceedings of the Third International Conference of Environmental Contamination*. CEP Edinburgh, pp. 79-81.
- Bowen, R.E. & Depledge, M.H.** 2006. Rapid assessment of marine pollution (RAMP). *Marine Pollution Bulletin*, **53**, 631-639.
- Del Ramo, J., Torreblanca, A., Martinez, M., Pastor, A. & Diaz-Mayans, J.** 1995. Quantification of cadmium-induced metallothionein in Crustaceans by silver-saturation method. *Marine Environmental Research*, **39**, 121-125.
- Fialkowski, W., Calosi, P., Dahlke, S., Dietrich, A., Moore, P.G., Olenin, S., Persson, L.E., Smith, B.D., Špegys, M. & Rainbow, P.S.** 2009. The sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda) as biomonitor of trace metals bioavailability in European coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, **58**, 39-44.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Fialkowska, E. & Smith, B.D.** 2000. Biomonitoring of trace metals along the Baltic Coast of Poland using the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea: Amphipoda). *Ophelia*, **52**, 183-192.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Smith, B.D. & Zmudzinski, L.** 2003. Seasonal variation in trace metal concentrations in three talitrid amphipods from the Gulf of Gdansk, Poland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **288**, 81-93.
- Geffard, A., Quéau, H., Dedourge, O., Biagianti-Risboug, S. & Geffard, A.** 2007. Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **145**, 632-640.
- Lafabrie, C., Pergent-Martini, C. & Pergent, G.** 2008. Metal contamination of *Posidonia oceanica* meadows along the Corsican coastline (Mediterranean). *Environmental Pollution*, **151**, 262-268.

- Mardsen, I.D. & Rainbow, P.S.** 2004. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology - the amphipod example? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **300**, 373-408.
- Martinez, M., Del Ramo, J., Torreblanca, A., Pastor, A. & Diaz-Mayans, J.** 1996. Cadmium toxicity, accumulation and metallothionein induction in *Echinogammarus echinosetosus*. *Journal of Environmental Science and Health A*, **31**, 1605-1617.
- Moore, P.G. & Rainbow, P.S.** 1987. Copper and zinc in an ecological series of talitroidean Amphipoda (Crustacea). *Oecologia*, **73**, 120-126.
- Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Cottier, A., Rainbow, P.S. & Smith, B.D.** 2002. Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, **57**, 225-242.
- Nassiri, Y., Rainbow, P.S., Amiard-Triquet, C., Rainglet, F. & Smith, B.D.** 2000. Trace-metal detoxification in the ventral caeca of *Orchestia gammarellus* (Crustacea: Amphipoda). *Marine Biology*, **136**, 477-484.
- Rainbow, P.S.** 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution*, **120**, 497-507.
- Rainbow, P.S., Fialkowski, W. & Smith, B.D.** 1998. The sandhopper *Talitrus saltator* as a trace metal biomonitor in the Gulf of Gdansk, Poland. *Marine Pollution Bulletin*, **36**, 193-200.
- Rainbow, P.S. & Moore, P.G.** 1986. Comparative metal analysis in amphipod crustaceans. *Hydrobiologia*, **141**, 273-289.
- Rainbow, P.S., Moore, P.G. & Watson, D.** 1989. Talitrid amphipods (Crustacea) as biomonitors for copper and zinc. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **28**, 567-582.
- Rainbow, P.S., Amirad-Triquet, C., Amiard, J.C., Smith, B.D., Best, S.L., Nassiri, Y. & Langston, W.J.** 1999. Trace metal uptake rates in crustaceans (amphipods and crabs) from coastal sites in NW Europe differentially enriched with trace metals. *Marine Ecology Progress Series*, **183**, 189-203.
- Roesijadi, G.** 1992. Metallothioneins and metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, **22**, 81-114.
- Siegel, S. & Castellan Jr. J.N.** 1989. *Non Parametric Statistics for the Behavioral Sciences*, 2nd edition, McGraw Hill, New York.
- Ugolini, A., Borghini, F., Calosi, P., Bazzicalupo, M., Chelazzi, G. & Focardi, S.** 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 526-532.
- Ugolini, A., Borghini, F., Focardi, S. & Chelazzi, G.** 2005. Heavy metals accumulation in two syntopic sandhopper species: *Talitrus saltator* (Montagu) and *Talorchestia ugoi* (Bellan Santini and Ruffo). *Marine Pollution Bulletin*, **50**, 1328-1334.

- Ugolini, A., Felicioni, S., Ruffo, S. & Cipriani, L.** 1995. Distribution of *Talorchestia ugolinii* and other sandhoppers in Corsica. *Bollettino di Zoologia*, **62**, 291-296.
- Ugolini, A., Ungherese, G., Somigli, S., Galanti, G., Baroni, D., Borghini, F., Cipriani, N., Nebbiai, M., Passaponti, M. & Focardi, S.** 2008. The amphipod *Talitrus saltator* as a bioindicator of human trampling on sandy beaches. *Marine Environmental Research*, **65**, 349-357.
- Ungherese, G. & Ugolini, A.** 2009. Sandhopper solar orientation as a behavioral biomarker of trace metals contamination. *Environmental Pollution*, **157**, 1360-1364.
- Ungherese, G., Baroni, D., Bruni, P., Focardi, S. & Ugolini, A.** 2007. Esposizione al rame e concentrazione di metallotioneine in *Talitrus saltator*. *Biologia Marina Mediterranea*, **14** (2), 414-415 (In Italian).
- Usero, J., González-Regalado, E. & Garcia, I.** 1997. Trace metals in the bivalve molluscs *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from the Atlantic coast of southern Spain. *Environment International*, **23**(3), 291-298.
- Usero, J., Morillo, J. & Garcia, I.** 2005. Heavy metals concentrations in molluscs from Atlantic coast of southern Spain. *Chemosphere*, **59**, 1175-1181.
- Viarengo, A.** 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *CRC Critical Review in Aquatic Science*, **1**, 295-317.
- Viarengo, A. & Nott, J.A** 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **104**(3), 355-372.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F. & Fabbri, R.** 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, **44**(1), 69-84.
- Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marro, A. & Fabbri, R.** 1999. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers*, **4**(6), 455-466.
- Weeks, J.M.** 1992. Copper-rich granules in the ventral caeca of talitrid amphipods (Crustacea; Amphipoda: Talitridae). *Ophelia*, **36**(2), 119-133.

CAPITOLO 4

Relationship between heavy metals pollution and genetic diversity in Mediterranean populations of the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda)

I dati presentati in questo capitolo sono stati oggetto di pubblicazione: G. Ungherese, A. Mengoni, S. Somigli, D. Baroni, S. Focardi, A. Ugolini, 2010, “**Relationship between heavy metals pollution and genetic diversity in Mediterranean populations of the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda)**”, Environmental Pollution, In press.

ABSTRACT

Trace metals are one of the groups of pollutants that reduce genetic variability in natural populations, causing the phenomenon known as “genetic erosion”. In this study we evaluate the relationship between trace metals contamination (Hg, Cd and Cu) and genetic variability, assessed using fluorescent Inter-Simple Sequence Repeats (fISSR). We used eight populations of a well-established biomonitor of trace metals on sandy beaches: the amphipod *Talitrus saltator*. The trace metals analysis confirmed the ability of sandhoppers to accumulate Hg, Cd and Cu. Moreover, populations from sites with high Hg availability had the lowest values of genetic diversity. Our results validate the use of fISSR markers in genetic studies in sandhoppers and support the “genetic erosion” hypothesis by showing the negative influence of Hg contamination on sandhopper genetic diversity. Therefore, genetic variability assessed with fISSR markers could be successfully employed as a biomarker of Hg exposure.

Keywords: amphipods, trace metals, genetic variability, bioaccumulation, Inter-Simple Sequence Repeats

1. INTRODUCTION

The genetic composition of natural populations is constantly modified by natural events (mutations, natural selection, stochastic processes and migrations). The evaluation of genetic diversity is especially important for species inhabiting transitional ecosystems, such as the supralittoral band of sandy shores, subjected to periodic and aperiodic changes in biotic and abiotic stress factors. Anthropogenic impact, such as pollution, can cause severe perturbations of the genetic structure. Understanding the effect of pollutants on genetic variability is fundamental in preserving the evolutionary potential of natural populations. Among the various groups of contaminants present in coastal areas, heavy metals seem to strongly affect genetic variability, both directly (via germ cell mutations) and indirectly (via somatic mutations or ecological and physiological effects) (Bickham et al., 2000; Belfiore and Anderson, 2001; De Wolf et al., 2004). By favoring more tolerant genotypes and causing demographic bottlenecks, trace metals exposure can alter the genetic composition of a population, leading to a decrease of genetic variability known as “genetic erosion” (Van Straalen and Timmermans, 2002).

Talitrid amphipods, one of the main components (in terms of biomass) of the supralittoral of sandy beaches, play an important role in the energy flow within the sandy beach ecosystem because they feed on organic matter of marine and terrestrial origin and provide nourishment for many species of beetles, fishes, birds and mammals (e.g. see Griffiths et al., 1983). The sandhopper *Talitrus saltator* is a well-established biomonitor of trace metals contamination, since studies carried out on the Baltic coast of Poland (Rainbow et al., 1998; Fialkowski et al., 2000, 2009), on the U.K. coast (Moore and Rainbow, 1987; Rainbow et al., 1989; Moore et al., 1991) and on Mediterranean shores (Ugolini et al., 2004, 2005, 2008) have demonstrated that *T. saltator* accumulates trace metals (mainly Cu, Cd, Hg, Zn, Mn, Al, Fe and Ni).

Despite the importance of the species, little is known about the genetic structure of *T. saltator* populations, especially at the micro-geographical scale where cycles of extinction and colonization may be frequent and detailed knowledge of population diversity and structure could be crucial for risk assessment of beach ecosystems. Previous studies have reported data on large-scale geographical variation in the whole Mediterranean basin (De Matthaeis et al., 1995, 1998, 2000; Scapini et al., 1999). They showed a high level of genetic variation and a pattern of genetic differentiation between populations fitting the isolation by distance model (De Matthaeis et al., 2000). However, it is unclear how the described patterns are applicable on a small geographical scale, i.e. how predictable is it that populations of *T. saltator* living in close proximity will exchange alleles.

To date, no molecular markers have been developed for analyses of *T. saltator* population genetics. Due to the low variability, the use of allozyme patterns has little use when high-resolution studies, such as those performed at

the micro-geographical scale, have to be performed. Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) are molecular markers with high resolving power at the population level which do not need prior molecular knowledge of the organisms (e.g. genome sequence, microsatellites, etc.); they also allow a large number of samples to be analyzed thanks to the possibility of automation by the use of fluorescently labeled primers and capillary electrophoresis in an automated sequencer (fISSR, Nagaraju et al., 2002). ISSR markers have been widely used in plants for germplasm characterization and population genetics studies (see for instance Semagn et al., 2006; He et al., 2007), and their use is now extending to animal population studies (e.g. Wink, 2006; Pazza et al., 2007; Machkour-M'Rabet et al., 2009) and taxon and cell line identification (e.g. Maltagliati et al., 2006; Tan et al., 2006).

In this study we evaluated the effects of three accumulated trace metals with high toxicity and harm for biological systems and human health (Hg, Cu and Cd) on the genetic variability of Mediterranean populations of *T. saltator*, assessed using fluorescent ISSR markers. Since previous research has shown that genetic variability in *T. saltator* seems to vary according to shoreline stability (Ketmaier et al., 2003; Scapini et al., 2005), we also took this factor into account.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Collection of samples

Eight populations of *T. saltator* were collected in June 2008 along the Tyrrhenian coast of central Italy (Fig. 1), from 10°16'31''E latitude to 11°11'41''E latitude, at sites with different degrees of trace metals contamination (Ugolini et al., 2004) and coastal stability (Albani et al., 1940; Ferretti et al., 2003; Rossi et al., 2008) (Tab. 1). Adult individuals (except for ovigerous female) were collected, transported alive to the laboratory and stored frozen at -80°C prior to DNA extraction and trace metals analysis. Since size can influence the amount of accumulated metals (Marsden and Rainbow, 2004) in amphipods, only individuals of similar weight (0.015 - 0.02 g) were used for Hg, Cd and Cu analysis. At each sampling site, a sample of sand was collected in the zone frequented by the sandhoppers during the day and analyzed for trace metals contamination.

2.2. DNA extraction and fluorescent ISSR amplification

DNA was extracted from animals stored at -80°C using a NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel). Single animals were washed in physiological solution to eliminate sand and residual material from the legs, ground in sterile 1.5 ml polypropylene tubes with sterile Teflon pestles and then subjected to DNA extraction according to the kit manufacturer's instructions.

Table 1. Main features and genetic diversity of the analyzed populations. Population name, code, number of animals analyzed and geographical coordinates are shown. See text for further explanations.

Population	Code	No. of animals	Longit.	Latit.	Coastal stability
Morto Vecchio	FM	16	43°44'55'	10°16'31''	stable
Arno river	FA	18	43°40'55'	10°16'52''	unstable
Calambrone	C	18	43°34'56'	10°17'56''	unstable
Rosignano Solvay	RS	14	43°22'24'	10°26'23''	unstable
Piombino	P	17	42°57'07'	10°34'11''	stable
Ombrone river	O	16	42°39'30'	11°00'50''	unstable
Albegna beach	AM	10	42°30'36'	11°11'30''	unstable
Albegna river	AF	14	42°30'16'	11°11'41''	stable

DNA was quantified by spectrophotometric readings (Biophotometer, Eppendorf) and gel electrophoresis after ethidium bromide staining. ISSR amplification was carried out in a total volume of 25 μ L containing 10 ng of template DNA, 2 U of *Taq* DNA polymerase (GoTaq, Promega), 10 pmols of fluorescently labeled ISSR primer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$ and 1X concentration of *Taq* DNA polymerase buffer (GoTaq, Promega). Cycling conditions were as follows: 5 min 95°C, followed by 40 cycles composed of 20 sec 95°C, 30 sec 66°C-1°C/cycle for the first 10 cycles and then 55°C, 2 min 72°C and a final extension step of 5 min 72°C. Amplification products from all 130 animals were resolved by capillary electrophoresis on an Applied Biosystems ABI PRISM® 3100 Automated Capillary Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using GenScan ROX 2500 (Applied Biosystems) as size standard. Fifteen animals from different populations were amplified twice to establish the reproducibility and background noise cut-off.

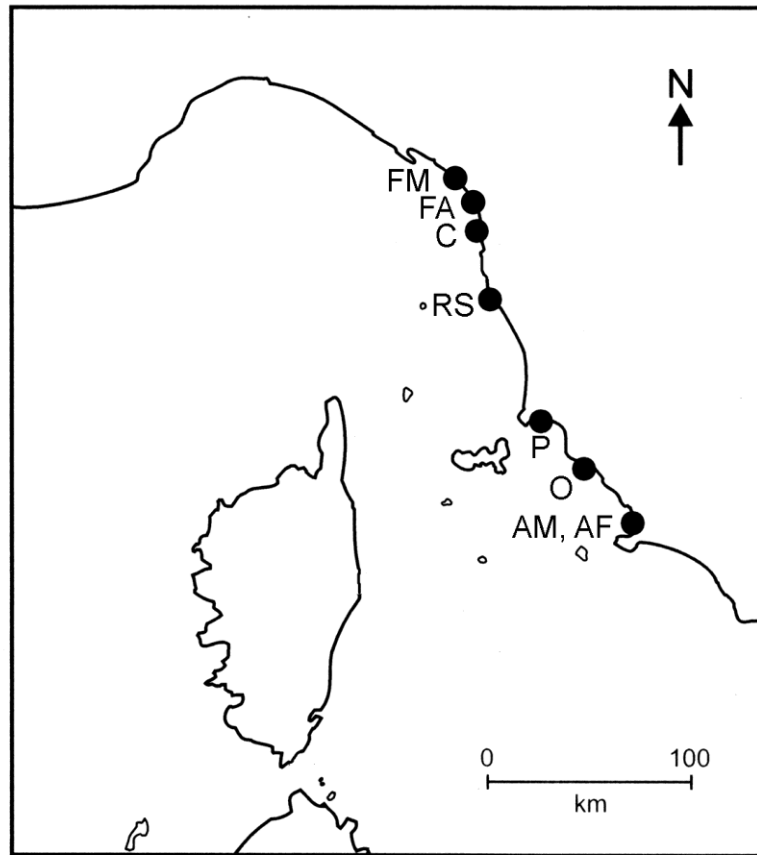


Fig. 1. Map of the Tyrrhenian coast of central Italy showing the sites where populations were collected.

2.2 Trace metals analysis

The samples of sand and sandhoppers were dehydrated at 40°C until constant weight (minimum 0.5 g dry weight) and then finely ground. Around 150 mg of each sample were mineralized in Teflon vessels containing 3 ml of HNO₃ at 120°C for 8 hours. After digestion, the solution was brought to a volume of 10 ml by addition of deionized water. During each mineralization, several “blank trials” were performed to verify the absence of contamination.

The analyses of metal contents were performed by atomic absorption spectrometry. Cd and Cu were determined by atomization with a graphite furnace and Zeeman background corrector, while the FIMS (Flow Injection Mercury System) was used for Hg. Each analysis was carried out three times and the accuracy of the analytical procedures was assessed by comparing the results of contemporary digestions and analyses of Standard Reference Materials (SRMs): SRM 1566 “oyster tissue” from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, USA). The results of the determinations were only accepted if the values measured for the SRMs were within the certified concentration range. The element concentrations (expressed as µg/g) were calculated by the method of “internal additions”. The coefficients of variation for the elements analyzed were between 5% and 10%.

2.3 Data analysis

The bioaccumulation of each metal in *T. saltator* was investigated by comparing the sand and sandhopper concentrations by means of the Sign test (Siegel and Castellan, 1989).

For the ISSR data, chromatogram files from automated sequencer sizing were imported into GeneMarker ver. 1.71 software (SoftGenetics LLC, State College, PA, USA) by filtering with the default options of the module for AFLP analysis. The cut-off values (200 fluorescence units for background noise and size range from 100 to 2000 nt) were set after analysis of replicate samples, taking into account only bands present in duplicate reactions from 15 test animals. Consequently, only peaks with the above-mentioned characteristics were considered for profile analysis of the whole dataset of 130 animals. Statistical analyses were performed on a binary matrix produced by linearly combining the results of different primers, assigning 1/0 values to band presence/absence. A matrix of genetic similarity between animals was computed with NTSYS-pc ver. 2.02 (Rohlf, 1990) based on presence/absence of bands, using Jaccard’s coefficient of similarity. Unlike Lynch and Milligan’s parameters for dominant markers (Lynch and Milligan, 1994), Jaccard’s coefficient takes into account only band presence sharing between individuals and is commonly used for the analysis of markers treated as dominant, such as ISSRs (Lowe et al., 2004).

Within-population genetic variation was computed as “mean number of pairwise differences” and “average gene diversity over loci” using Arlequin

3.11 software (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>). Analysis of Molecular Variance (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) as implemented in Arlequin 3.11 was used to analyze the partition of total genetic variation at three hierarchical levels: within populations, between populations and between groups of populations. The statistical significance was computed by a permutation test after 10 000 random permutations. The Bayesian clustering method for dominant markers, implemented by a Markov chain Monte Carlo algorithm present in Structure 2.2 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2007), was also used to identify the population structure. Data were obtained with runs of 100 000 iterations (three times for each K-value) and a burning of 20 000 iterations.

Genetic distances between populations were estimated by computing a matrix of pairwise F_{ST} values (Slatkin, 1995) which was then used to infer a Neighbor-Joining dendrogram with MEGA4 software (Tamura et al., 2007). The significance of pairwise F_{ST} values was computed by a permutation test after 1000 random permutations.

Pairwise F_{ST} values were compared with the linear and log-transformed geographical distances between populations according to Mantel's test (Mantel, 1967) as implemented in NTSYS-pc ver. 2.02 (Rohlf, 1990); normalized Mantel Z statistics were calculated after 1000 permutations.

The Spearman rank-order correlation coefficient test (Siegel and Castellan, 1989) was used to establish if there were relationships between trace metals pollution and genetic variability and between stability of the coastal environment and genetic variability.

3. RESULTS

3.1 Trace metals accumulation

Figure 2 and table 2 shows that the concentrations of Hg, Cd and Cu in amphipod tissues were generally higher than those in the sand ($n = 8$, $x = 1$, $p = 0.035$ for Hg, $n = 8$, $x = 0$, $p = 0.004$ for Cu and Cd).

3.2 ISSR fingerprinting

Ten primers [ISSR#1: HVH(TTC)₄; ISSR#2: YG(CA)₉; ISSR#3: (CA)₇; ISSR#4: (CA)₇RY; ISSR#5: RY(CA)₇; ISSR#6: V(CT)₈D; ISSR#7: B(GA)₅H; ISSR#8: (TGA)₅; ISSR#9: YG(GA)₉; ISSR#10: YG(CT)₉] were initially screened for the presence of amplification products, reproducibility, readability and pattern polymorphism in DNA of two animals from different populations. Two of the primers (ISSR#5 and ISSR#9) gave the most successful results and were used for the analysis of all samples. These two primers produced 54 polymorphic bands (markers) ranging from 242 to 1014 bp for ISSR#9 (46 markers) and from 369 to 581 bp for ISSR#5 (8 markers). In total, 504 bands were retrieved in 130 animals. Each animal showed an average of 3.77 ± 1.16 markers.

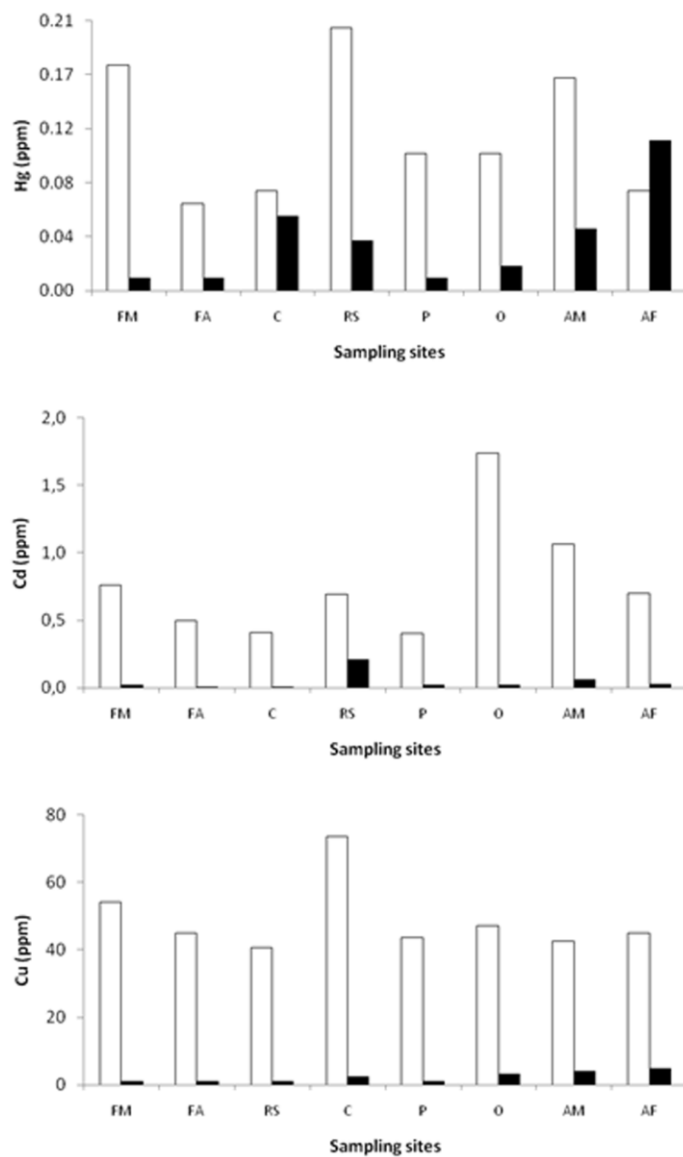


Fig. 2. Trace metals concentrations (ppm) in the sand (black bars) and in the sandhoppers (white bars). For each element, sampling sites are ordered according to the increase of metal concentration in the sand. For further explanations, see Fig. 1 and Tab. 1.

Table 2. Genetic diversity of analyzed populations, estimated as “average gene diversity over loci” and “mean number of pairwise differences”; Npm: number of private markers. Hg, Cd and Cu concentration in sandhoppers is also shown. For further explanations, see Table 1 and text.

Population code	Genetic diversity		Npm	Metals concentration (ppm)		
	Mean number of pairwise differences	Average gene diversity over loci		Hg	Cd	Cu
FM	4.30	0.0796	0	0.18	0.76	54.2
FA	5.75	0.1065	1	0.07	0.50	44.9
C	5.41	0.1000	2	0.08	0.41	73.6
RS	4.83	0.089	0	0.21	0.69	40.6
P	6.11	0.1132	2	0.11	0.40	43.7
O	5.40	0.1001	0	0.11	1.74	47.2
AM	4.33	0.0802	0	0.17	0.70	42.4
AF	6.89	0.1275	2	0.08	1.06	45.0

3.4 Genetic diversity

The variation of within-population genetic diversity was quite high (Table 2), ranging from 4.30 (mean number of pairwise differences) of population FM to 6.89 of population AF. Only two markers were present in all populations (public alleles), 40 were distributed in 2-6 populations, while 12 were restricted to one population only (private alleles). The distribution of private markers among populations is also reported in Table 2.

Four populations did not show private alleles (AM, FM, O, RS), while the others showed one or two private alleles.

3.5 Hierarchical structure of genetic variation

AMOVA (Table 3) showed that the genetic differentiation among populations was relatively high ($F_{ST} = 0.165$). The greatest proportion of the total variation in our sample (83.45 %) was due to intra-population differences, rather than to among-population differences (16.55 %). The geographical differentiation of populations was also tested. The partition of populations into five and six groups gave the highest among-group variance components (also with significant P values). Moreover, the Bayesian inference of population structure performed with Structure 2.2 gave similar results, with maximal Ln-likelihood at K=5 (-1191.4).

Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) in 123 individuals from eighth *T. saltator* populations: a) overall; b) and c) geographical partition with different groupings ^a

a) Overall

Source of variation	d.f	Sum of squares	Variance	% Total	P
Among populations	7	76.749	0.53848	16.55	<0.0001
Within populations	11	312.357	2.71615	83.45	<0.0001
Total	12	389.106	3.25463		
	2				

b) Five groups partition

Source of variation	d.f	Sum of squares	Variance	% Total	P
Among groups	4	63.693	0.51342	15.39	<0.008
Among populations / Groups	3	13.056	0.10604	3.18	<0.0001
Within populations	11	312.357	2.71615	81.43	<0.0001
Total	12	389.106	3.33560		
	2				

c) Six groups partition

Source of variation	d.f	Sum squares	of Variance	% Total	P
Among groups	5	70.157	0.58480	17.54	<0.02
Among populations / Groups	2	6.592	0.03350	1.00	<0.0001
Within populations	115	312.357	2.71615	81.46	<0.0001
Total	122	389.106	3.33445		

^a The AMOVA was performed attributing the following two types of geographical groupings: b) north-south gradient with five groups (FM, FA, C); (RS); (P), (O); (AM, AF); c) north-south gradient with six groups (FM, FA, C); (RS); (P), (O); (AM); (AF). For each grouping, the percentage of total variance observed was attributed to two or three hierarchical partitions: among groups; among populations within groups; among single individuals within populations. Data show the degrees of freedom (d.f.), the sum of squared deviation, the variance component estimate, the percentage of total variance contributed by each component and the probability of obtaining a more extreme component estimate by chance alone (P). P-values were estimated by computing 10,000 permutations.

3.6 Genetic differentiation between populations

The Neighbor-Joining dendrogram of populations based on pairwise F_{ST} (Figure 3a) showed a well-structured pattern of genetic distances. Two main clusters could be recognized within the *T. saltator* group: populations P, AM, AF and populations O, RS, FA, C, FM, corresponding to the southern and northern groups of localities indicated in Figure 1. This subdivision was statistically well supported and accounted for 15.1% of the variation (as computed with AMOVA, $P < 0.04$). Within the cluster corresponding to the northern populations, the most similar ones (C, FM and FA) formed a tight sub-cluster. Since there was no statistical support for the pairwise F_{ST} values between them (Figure 3b), it can be assumed that these three populations form a unique group with no differentiation among them. In contrast, there are significant pairwise F_{ST} values between all three populations (P, AM, AF) in the southern cluster, supporting their genetic differentiation.

To test for a geographically-based distribution of genetic diversity, we carried out Mantel's test of correlation between genetic and geographical distances. The results indicated a high level of correlation with both linear ($r = 0.805$; $p < 0.005$) and log-transformed ($r = 0.640$; $p < 0.007$) geographical distances.

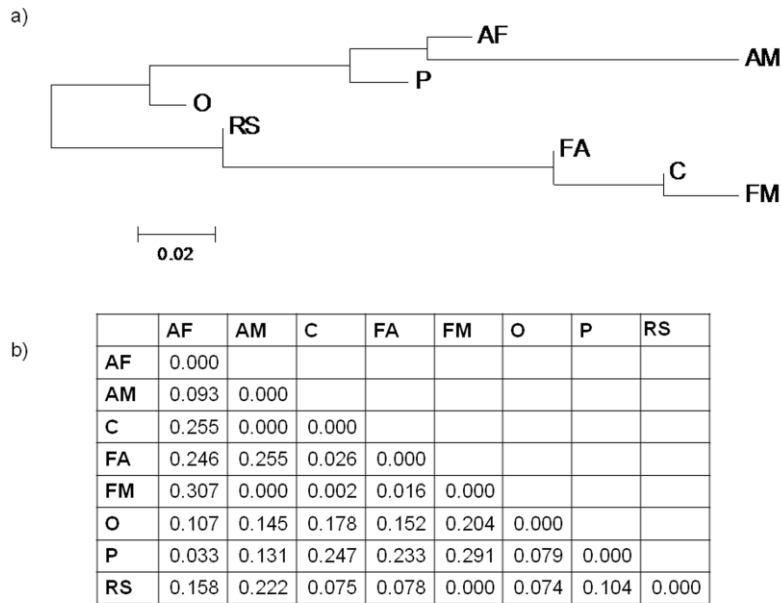


Fig. 3. Genetic differentiation between populations. a) Neighbor-joining dendrogram; b) pairwise F_{ST} (values in bold indicate non-significant values at $P < 0.05$)

3.7 Trace metals accumulation and genetic diversity

Among all the metals analyzed, only Hg showed a significant correlation between metal concentration and genetic variability of populations ($r_s = -0.74$, d.f. = 7, $p < 0.05$) (Fig. 4). In fact, the sandhoppers collected from the sampling sites with the highest Hg levels (RS = 0.21 ppm, FM = 0.18 ppm, AM = 0.17 ppm, Fig. 4) had the lowest levels of genetic variability (Table 2). There was no significant correlation between genetic diversity and metal concentration for Cd and Cu ($r_s = -0.54$, d.f. = 7, $p = N.S.$ for Cd; $r_s = -0.02$, d.f. = 7, $p = N.S.$ for Cu) (Fig. 4).

3.8 Coastal stability and genetic diversity

The sampling sites were divided into “stable” and “unstable” based on data recorded from late 1800 (Albani et al., 1940) to 2008 (Ferretti et al., 2003; Rossi et al., 2008). The Spearman rank-order correlation test did not show a significant correlation between coastal stability and genetic variability ($r_s = -0.28$, d.f. = 7, $p = N.S.$).

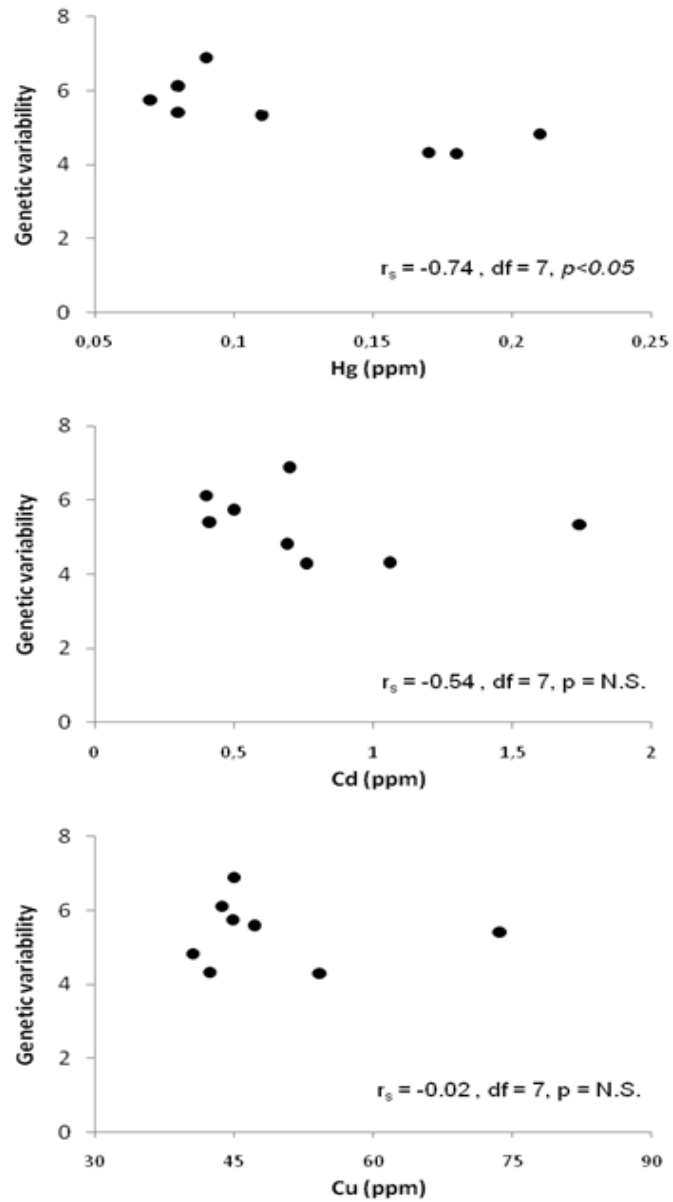


Fig. 4. Relationship between trace metals concentrations in tissues of *T. saltator* (expressed in ppm) and genetic variability (expressed as mean number of pairwise differences). For each metal the value of Spearman rank – order correlation coefficient test (r_s), degrees of freedom (df) and probability (p) are given. For further explanations see also Table 2

4 DISCUSSION

The results of our trace metals analysis agree with previous data regarding the Tuscan coast (Ugolini et al., 2004; 2008) and confirm the ability of sandhoppers to accumulate Hg, Cd and Cu showing differences among sampling sites (see Marsden and Rainbow, 2004 for a review).

The developed markers, based on two primers having a (CA)₇ and a (GA)₉ repeat motif (ISSR#5 and ISSR#9, respectively), resulted in 54 highly polymorphic markers which produced 502 alleles (bands) in 130 animals. In spite of the narrow geographical range, the analysis of private markers revealed that populations AF, P, C, FA present unique alleles, suggesting that the gene flow between populations is quite low or that several bottlenecks, with reduction in effective population size followed by rapid expansion, could have taken place. In this view, the mismatched distribution for populations AF, P and FA (data not shown) approximates a bimodal curve, which could support the hypothesis of bottlenecks for those populations. However, an analysis with other markers (e.g. co-dominant microsatellites) is needed to resolve this issue. Genetic diversity values varied relatively little. However, populations with no private alleles tended to have lower values of genetic diversity; in particular, populations RS and AM showed some of the lowest genetic diversity values. Populations with the lowest diversity values also inhabited sites heavily contaminated by Hg, and there was a significant negative correlation between Hg concentration and genetic variability of populations. Exposure to genotoxic chemicals such as Hg can act as a selective force, eliminating sensitive genotypes within a population with predictable changes in genetic variability in affected populations. Results of other studies support the correlation between Hg exposure and genetic diversity. Populations of the sunfish *Lepomis auritus* from Hg-contaminated rivers showed differences in genetic distances with respect to unexposed populations (Nadig et al., 1998). Individuals of the marine gastropod *Monodonta turbinata* from Hg-contaminated areas had high amounts of Hg-tolerant allozymes with respect to animals sampled in uncontaminated areas (Nevo et al., 1984). Our findings seem to confirm the important role of Hg contamination as a selective force in contaminated populations.

Hg contamination in the most polluted localities is well documented. RS is located near the Solvay chemical plant (built in 1918) whose effluents, characterized by high levels of Hg, discharge directly into the sea (Ferrara et al., 1989). AM is affected by the cinnabar (HgS) geological anomaly on Mt. Amiata and in particular by the Hg mining conducted from the Etruscan period (8th - 1st century B.C.) to 1980 (Barghigiani et al., 1996).

The high sensitivity of *T. saltator* to Hg contamination is also supported by the LC₅₀ data reported by Ungherese and Ugolini (2009). For this species, Hg is more toxic than Cu and Cd, with wide differences in the LC₅₀ values: 0.02 ppm for Hg, 13.28 for Cu and 27.66 for Cd (Ungherese and Ugolini, 2009). Therefore, although we cannot exclude the influence of other pollutants, Hg

seems to have an important role in the reduction of genetic variability in *T. saltator*. Moreover, on the Tuscan coast, genetic erosion has recently been detected in the littoral crab *Pachygrapsus marmoratus* from sites with different degrees of As, Cd, Pb and Cu contamination (Fratini et al., 2008). Our analyses did not reveal a correlation between coastal stability and genetic diversity, as proposed by other authors (Ketmaier et al., 2003; Scapini, et al., 2005). Therefore, contrary to the results of these authors, trace metals contamination (particularly Hg) rather than coastal stability seems to have a negative influence on the genetic diversity of *T. saltator* populations.

The gene flow between *T. saltator* populations was then investigated by analysis of the population structures. We found a good correlation between geographical distance and genetic distance between populations, in agreement with an isolation-by-distance model as previously proposed for this species over a larger geographical range (De Matthaeis et al., 2000). Moreover, we found structuring of populations in a northern and a southern group. In the latter, there was unexpected differentiation, even at a very small scale (AM-AF, about 600 m apart). Sympatric differentiation in tidal and estuarine animals due to behavioral and ecological causes has already been detected (Stanhope et al., 1992; Bilton et al., 2002; Vesakoski et al., 2009). However, further investigations into the eco-ethology and physiology of these two populations are necessary to fully understand the basis of the quasi-sympatric differentiation. In the northern Tuscany populations (FM, FA, C), only the last one (C) was differentiated from the others, revealing higher gene flow between northern populations than between southern ones. This suggests that local conditions have a high impact on the *T. saltator* population structure and may strongly influence gene flow between sites, even at a very small scale.

5. CONCLUSIONS

Talitrid amphipods such as the sandhopper *T. saltator* are well-established biomonitors of trace metals contamination. Despite their recognized role as bioindicators of human impact on sandy beaches, no molecular markers have been developed to allow rapid and high-throughput screening of genetic diversity in talitrids. We applied fluorescent Inter-Simple Sequence Repeats (fISSR) to *T. saltator*, aiming to investigate the genetic diversity and structure of eight populations inhabiting the Tyrrhenian (western) coast of central Italy and their relationships with trace metal contents (Hg, Cd, Cu). This study demonstrates the usefulness of fISSR markers in investigations of *T. saltator* population genetics. Indeed, these markers reveal differences among populations despite the small geographical range.

Our results also support the “genetic erosion” hypothesis (Van Straalen and Timmermans, 2002) and highlight the role of Hg pollution in the reduction of population genetic diversity. The Hg concentrations in the sandhopper tissues were negatively correlated to the genetic variability. Coastal stability seems not

to affect the genetic variability of sandhoppers. Therefore, genetic differences assessed with fISSR markers could be used as valid biomarkers to detect Hg exposure in *T. saltator* and could be used to identify coastal areas where Hg contamination is particularly strong.

Acknowledgments

The research was financially supported by the Fondazione Monte dei Paschi (Siena) (grants 31017 and 33798 assigned to A. Ugolini). We are grateful to F. Luzzi for technical assistance with DNA manipulation. Thanks are due to the Ente Parco Regionale di Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli (Pisa) for authorizing the sampling.

6. REFERENCES

Albani, D., Griselli, A. & Mori, A. 1940. Le spiagge toscane. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma.

Arlequin ver. 3.11. An Integrated Software for Population Genetics Data Analysis. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>

Barghigiani, C., Ristori, T. & Lopez Arenas, J. 1996. Mercury in marine sediments from a contaminated area of the northern Tyrrhenian sea: <20 µm grain-size fraction and total sample analysis. *Science of the Total Environment*, **192**, 63-73.

Belfiore, N.N. & Anderson, S.L. 2001. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research*, **489**, 97-122.

Bickham, J.W., Sandhu, S., Herbert P.D.N., Chikhi, L. & Athwal, R. 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutation Research*, **463**, 33-51.

Bilton, D.T., Paula, J. & Bishop, J.D.D. 2002. Dispersal, genetic differentiation and speciation in estuarine organisms. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **55**, 937-952.

De Matthaeis, E., Cobolli, M., Mattoccia, M. & Scapini, F. 1995. Geographic variation in *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) – Biochemical evidence. *Bollettino di Zoologia*, **62**, 77-84.

De Matthaeis, E., Davolos, D. & Cobolli, M. 1998. Genetic divergence between populations and species of talitrids from Aegean Islands. *Journal of Heredity*, **89**, 37-43.

De Matthaeis, E., Davolos, D., Cobolli, M. & Ketmaier, V. 2000. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations of four talitrid species in the Mediterranean Sea. *Evolution*, **54**, 1606-1613.

De Wolf, H., Blust, R. & Backeljau, T. 2004. The population genetic structure of *Littorina littorea* (Mollusca: Gastropoda) along a pollution gradient

in the Scheldt estuary (The Netherlands) using RAPD analysis. *Science of the Total Environment*, **325**, 59-69.

Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.

Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 574-578.

Ferrara, R., Maserti, E. & Paterno, P. 1989. Mercury distribution in maritime sediments and its correlation with the *Posidonia oceanica* prairie in a coastal area affected by a chlor-alkali complex. *Toxicology and Environmental Chemistry*, **22**, 131-134.

Ferretti, O., Delbono, I., Furia, S. & Barsanti, M. 2003. *Elementi di gestione costiera. Parte Seconda. Erosione costiera. Lo stato dei litorali italiani*. Rapporto Tecnico ENEA RT/2003/43/CLIM.

Fialkowski, W., Calosi, P., Dahlke, S., Dietrich, A., Moore, P.G., Olenin, S., Persson, L.E., Smith, B.D., Špegys, M. & Rainbow, P.S. 2009. The sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda) as biomonitor of trace metals bioavailability in European coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, **58**, 39-44.

Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Fialkowska, E. & Smith, B.D. 2000. Biomonitoring of trace metals along the Baltic Coast of Poland using the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea: Amphipoda). *Ophelia*, **52**, 183-192.

Fratini, S., Zane, L., Ragionieri, L., Vannini, M. & Cannicci, S. 2008. Relationship between heavy metal accumulation and genetic variability decrease in the intertidal crab *Pachygrapsus marmoratus* (Decapoda; Grapsidae). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **79**, 679-686.

Griffiths, C.L., Stenton - Dozey, J.M.E. & Koop, K. 1983. Kelp wrack and the flow of energy through a sandy beach ecosystem. In: *Sandy beaches as ecosystems* (Ed. by A. McLachlan & T. Erasmus), pp. 547-556, Junk Publ., The Hague.

He, F., Kang, D., Ren, Y., Qu, L.J., Zhen, Y. & Gu, H. 2007. Genetic diversity of the natural populations of *Arabidopsis thaliana* in China. *Heredity*, **99**, 423-431.

Ketmaier, V., Scapini, F. & De Matthaeis, E. 2003. Exploratory analysis of talitrid population genetics as an indicator of the quality of sandy beaches. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **58**, 159-167.

Lowe, A., Harris, S. & Ashton, P. 2004. *Ecological genetics. Design, analysis, and application*. Blackwell, Oxford.

Lynch, M. & Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, **3**, 91-99.

Machkour-M'Rabet, S., Hénaut, Y., Dor, A., Pérez-Lachaud, G., Pélissier, C., Gers, C. & Legal, L. 2009. ISSR (Inter Simple Sequence

Repeats) as molecular markers to study genetic diversity in tarantulas (Araneae, Mygalomorphae). *Journal of Arachnology*, **37**, 10-14.

Maltagliati, F., Lai, T., Casu, M., Valdesalici, S. & Castelli, A. 2006. Identification of endangered Mediterranean cyprinodontiform fish by means of DNA inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Biochemical Systematics and Ecology*, **34**, 626-634.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209-220.

Mardsen, I.D. & Rainbow, P.S. 2004. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology - the amphipod example? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **300**, 373-408.

Moore, P.G. & Rainbow, P.S. 1987. Copper and zinc in an ecological series of talitroidean Amphipoda (Crustacea). *Oecologia*, **73**, 120-126.

Moore, P.G., Rainbow, P.S. & Hayes, E. 1991. The beach-hopper *Orchestia gammarellus* (Crustacea: Amphipoda) as a biomonitor for copper and zinc: North Sea trials. *Science of the Total Environment*, **106**, 221-238.

Nadig, S.G., Lee, K.L. & Adams, S.M. 1998. Evaluating alterations of genetic diversity in sunfish populations exposed to contaminants using RAPD. *Aquatic Toxicology*, **43**, 163-178.

Nagaraju, J., Kathirvel, M., Subbaiah, E.V., Muthulakshmi & M., Kumar, L.D. 2002. FISSR-PCR: a simple and sensitive assay for high throughput genotyping and genetic mapping. *Molecular and Cellular Probes*, **16**, 67-72.

Nevo, E., Ben-Schlomo, R. & Lavie, B. 1984. Mercury selection of allozymes in marine organisms: prediction and verification in nature. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **81**, 1258-1259.

Pazza, R., Kavalco, K.F., Prioli, S., Prioli, A.J. & Bertollo, L.A.C. 2007. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae), Part 3: Analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, **35**, 843-851.

Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.

Rainbow, P.S., Fialkowski, W. & Smith, B.D. 1998. The sandhopper *Talitrus saltator* as a trace metal biomonitor in the Gulf of Gdansk, Poland. *Marine Pollution Bulletin*, **36**, 193-200.

Rainbow, P.S., Moore, P.G. & Watson, D. 1989. Talitrid amphipods (Crustacea) as biomonitors for copper and zinc. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **28**, 567-582.

Rohlf, F.J. 1990. NTSYS-pc. *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Version 2.02. Exeter Software, New York.

Rossi, S., Querci, P., Giovannoni, G. & Mastri, R. 2008. *Relazione sullo stato dell'ambiente in Toscana 2008*. ARPAT- Regione Toscana, Edifir-Edizioni Firenze.

- Scapini, F., Campacci, F. & Audoglio, M.** 1999. Variation among natural populations of *Talitrus saltator* (Amphipoda): Morphometric analysis. *Crustaceana*, **72**, 659-672.
- Scapini, F., Chelazzi, L., Colombini, I., Fallaci, M. & Fanini, L.** 2005. Orientation of sandhoppers at different points along a dynamic shoreline in southern Tuscany. *Marine Biology*, **147**, 919-926.
- Semagn, K., Bjornstad, A. & Ndjiondjop, M.N.** 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, **5**, 2540-2568.
- Siegel, S. & Castellan, J.J.N.** 1989. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*, 2nd edition, McGraw Hill, New York.
- Slatkin, M.** 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**, 457-462.
- Stanhope, M.J., Leighton, B.J. & Hartwick, B.** 1992. Polygenic control of habitat preference and its possible role in sympatric population subdivision in an estuarine crustacean. *Heredity*, **69**, 279-288.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599.
- Tan, G.L., Chu, Y.M., Chen, J.B. & Li, H.Q.** 2006. Genomic instability in the progression of sporadic nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngology. Head and Neck Surgery*, **134**, 147-152.
- Ugolini, A., Borghini, F., Calosi, P., Bazzicalupo, M., Chelazzi, G. & Focardi, S.** 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 526-532.
- Ugolini, A., Borghini, F., Focardi, S. & Chelazzi, G.** 2005. Heavy metals accumulation in two syntopic sandhopper species: *Talitrus saltator* (Montagu) and *Talorchestia ugolinii* (Bellan Santini and Ruffo). *Marine Pollution Bulletin*, **50**, 1328-1334.
- Ugolini, A., Ungherese, G., Somigli, S., Galanti, G., Baroni, D., Borghini, F., Cipriani, N., Nebbiai, M., Passaponti, M. & Focardi, S.** 2008. The amphipod *Talitrus saltator* as a bioindicator of human trampling on sandy beaches. *Marine Environmental Research*, **65**, 349-357.
- Ungherese, G. & Ugolini, A.** 2009. Sandhopper solar orientation as a behavioral biomarker of trace metals contamination. *Environmental Pollution*, **157**, 1360-1364.
- Van Straalen, N.M., & Timmermans, M.J.T.N.** 2002. Genetic variation in toxicant-stressed populations: an evaluation of the “genetic erosion” hypothesis. *Human and Ecological Risk Assessment*, **8**, 983-1002.
- Vesakoski, O., Rautanen, J., Jormalainen, V. & Ramsay, T.** 2009. Divergence in host use ability of a marine herbivore from two habitat types. *Journal of Evolutionary Biology*, **22**, 1545-1555.

Wink, M. 2006. Use of DNA markers to study bird migration. *Journal of Ornithology*, **147**, 234-244.

CAPITOLO 5

Il comportamento fototattico di *Talitrus saltator* (Montagu) come biomarker dell'esposizione a Cu, Cd e Zn.

I risultati presentati nel seguente capitolo sono stati ottenuti in collaborazione con la Dott. Flavia Pireddu, il Dott. Luca Mercatelli (Istituto Nazionale di Ottica Applicata CNR Firenze), Prof. A. Ugolini.

1. INTRODUZIONE

Uno degli aspetti fondamentali su cui punta l'attenzione l'ecotossicologia è rappresentato dall'identificazione del bersaglio primario di azione di un composto inquinante (Vighi e Bacci, 1998). La tossicità primaria di un contaminante si esercita a livello biochimico e molecolare e, solo successivamente, gli effetti si possono riscontrare, con un meccanismo a cascata, ai livelli superiori dell'organizzazione biologica (organulo cellulare, cellula, tessuto, individuo, fino a giungere al livello di popolazione e comunità). Parallelamente all'impatto negativo dell'inquinante ai diversi livelli strutturali, gli organismi sviluppano delle risposte adattative allo stress chimico che tendono a riportare il sistema ad uno stato di omeostasi. Quando però il meccanismo omeostatico difensivo non è sufficiente a bilanciare l'azione del contaminante, l'effetto negativo si manifesta ai livelli più alti dell'organizzazione gerarchica. Le diverse risposte che un organismo genera nei confronti di un insulto chimico rappresentano dei potenziali biomarker di contaminazione ambientale. Il ruolo dei biomarkers non è quello di dare informazioni quantitative sui livelli di esposizione di un organismo, ma è quello di fornire indicazioni sul suo stato di salute come segnale potenziale di alterazioni ambientali. Le risposte comportamentali sono state impiegate solo recentemente come biomarker nonostante abbiano degli evidenti legami con gli effetti che si manifestano a livello biochimico e fisiologico ed, inoltre, chiare connessioni sugli effetti a livello di popolazioni e comunità, (Depledge et al., 1995; Weis et al., 2001; Amiard – Triquet, 2009). I contaminanti, infatti, possono agire direttamente sugli organi di senso (meccanorecettori, chemorecettori, fotorecettori), sul sistema ormonale o sui neurotrasmettitori (GABA, serotonina, dopamina) generando così conseguenze negative sul comportamento (Blaxter e Ten Hallers – Tjabbes, 1992; Scott e Sloman, 2004; Amiard – Triquet, 2009). Ad esempio, studi condotti soprattutto su pesci hanno dimostrato che numerosi composti inquinanti (soprattutto pesticidi come DDT, clorpirifos, diazinone, malation, carbofurano), inibendo l'attività dell'acetilcolinesterasi, impediscono la degradazione dell'acetilcolina a livello post – sinaptico e alterano, di conseguenza, la trasmissione nervosa con conseguenze negative sul comportamento alimentare e sulla capacità di nuotare (si vedano per una revisione Weis et al., 2001; Scott e Sloman, 2004; Amiard – Triquet, 2009).

Tuttavia, per poter utilizzare una risposta comportamentale come biomarker è necessario che questa sia facilmente quantificabile in laboratorio (Fossi, 2000). Un tipo di risposta comportamentale che presenta queste caratteristiche è la risposta fototattica, che consiste in una reazione orientata a uno stimolo luminoso e può essere di tipo positivo (movimento verso la luce) o negativo (movimento in direzione opposta a quella della sorgente luminosa) (Michels et al., 1999, 2000; Martins et al., 2007). La fototassia è il risultato integrato degli effetti che si manifestano sul sistema nervoso e muscolare e,

inoltre, è ecologicamente rilevante e caratterizzata da un'elevata sensibilità ai contaminanti (Michels et al., 1999, 2000; Martins et al., 2007). Infatti, studi condotti sul cladocero *Daphnia magna* hanno evidenziato l'elevata sensibilità di questo tipo di risposta comportamentale rispetto ai saggi tossicologici standard come LC₅₀ (Yuan et al., 2003). Infatti, l'effetto negativo del Cu sul comportamento fototattico di *D. magna* è evidente dopo 3 ore di esposizione a 0.0056 ppm di Cu, una concentrazione molto più bassa rispetto ai valori di LC₅₀ a 24 ore (0.031 ppm) e 48 ore (0.021 ppm) (Yuan et al., 2003). Per le ragioni appena elencate questa risposta comportamentale è stata ampiamente impiegata in test tossicologici con cladoceri utilizzando differenti inquinanti quali naftalene (Whitman e Miller, 1982), Cu e Cd (Michels et al., 2000; Yuan et al., 2003), PO₄⁻, NO₃⁻ e Zn (Yuan et al., 2003), pentaclorofenolo (PLP) (Michels et al., 1999), lindano, cloruro di mercurio, benzo (a) fluorantene, TBTO, linuron, tiram, tetraclorometano e As (Martins et al., 2007). I risultati di questi studi hanno mostrato, ad esempio, che l'esposizione a basse concentrazioni di naftalene, PLP, Cu e Cd portava, dopo un breve periodo, a una diminuzione lineare del comportamento fototattico positivo in *D. magna* al crescere della concentrazione di esposizione (Whitman e Miller, 1982; Michels et al., 1999; 2000; Yuan et al., 2003). Risultati analoghi sono stati riportati per *Daphnia carinata* in risposta alla presenza di Cu, Cd e Zn (Wu et al., 2008). Inoltre, studi effettuati da Michels et al. (2000) hanno evidenziato l'importanza del tempo di esposizione all'inquinante nella risposta fototattica. Infatti, è stato osservato che individui di *D. magna* esposti a una concentrazione di Cd di 0.06 ppm per un periodo che andava dalle 2 alle 6 ore, mostravano una diminuzione significativa della fotopositività con l'aumentare del tempo di esposizione a parità di concentrazione di esposizione (Michels et al., 2000). Studi condotti su copepodi (Stearns e Sharp, 1994), branchiopodi (Bartolomé e Sanchez – Fortún, 2005) e su cercarie (Morley et al., 2003) hanno dimostrato come il comportamento fototattico sia alterato dall'esposizione a metalli pesanti, erbicidi o in risposta a condizioni ambientali sfavorevoli. Benché la letteratura sia ricca di indagini sul comportamento fototattico di specie appartenenti a taxa diversi, le ricerche che utilizzano tale comportamento per una valutazione di tipo strettamente ecotossicologico sono molto scarse.

Come precedentemente esposto nel Cap. 1, gli anfipodi talitridi sopralitorali, e in particolar modo *T. saltator*, sono stati ampiamente utilizzati come biomonitor per la valutazione della contaminazione ambientale da metalli in traccia nelle zone costiere (si veda Mardsen e Rainbow, 2004, per una revisione). Al contrario, le ricerche condotte nel campo dei biomarkers su queste specie risultano quasi assenti (Mouneyrac et al., 2002; Ungherese e Ugolini, 2009). Lo scopo di questo studio è di valutare il possibile utilizzo della risposta fototattica in *T. saltator* come biomarker dell'esposizione a metalli in traccia (Cu, Cd e Zn). I metalli utilizzati sono caratterizzati da un differente grado di tossicità per *T. saltator* come evidenziato dai dati dell'LC₅₀ a 96 ore (Ungherese Ugolini, 2009). Inoltre, la risposta fototattica è stata misurata in

animali saggiati al variare di alcuni fattori che influenzano l'orientamento solare quali la salinità del medium acquoso (Terracini Debenedetti, 1963; Scapini, 1979), la concentrazione di Ca^{2+} (Ugolini et al., 2009) e l'intensità luminosa. Per quel che riguarda quest'ultimo fattore, studi condotti da Ercolini e Scapini (1976) hanno dimostrato che i talitri rispondono in modo fotopositivo se sottoposti a una scelta tra una luce monocromatica e buio, e una chiara preferenza per le lunghezze d'onda più corte se contemporaneamente esposti a due luci monocromatiche opposte di uguale energia.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Allevamento e raccolta

Esemplari adulti appartenenti alla specie *T. saltator* sono stati raccolti presso la Foce di Fiume Morto Vecchio (Parco Regionale di Migliarino, S. Rossore, Massaciuccoli, Pisa), nella primavera- estate 2008. Gli animali sono stati posti in vaschette di plastica contenenti sabbia umida e, in laboratorio, sono stati trasferiti in vasche più grandi (14 x 24 cm) contenenti sabbia umida prelevata dalla località di provenienza. In laboratorio la temperatura era mantenuta a circa 24°C, l'illuminazione era assicurata da lampade al neon e il ritmo luce : buio era controllato da un sistema temporizzato corrispondente in fase e durata al ritmo naturale. Gli animali venivano nutriti 2 volte a settimana con mangime secco per pesci (Sera Vipar) posto su piccoli quadretti di carta assorbente.

2.2. Apparato sperimentale

Gli esperimenti venivano effettuati di giorno, dalle ore 9:30 alle ore 13:30, presso l'Istituto Nazionale di Ottica Applicata (INOA) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) di Firenze. Essi prevedevano l'utilizzo di un corridoio in plexiglass, lungo 60 cm e dal diametro di 4.5 cm poggiante su due supporti, posto orizzontalmente e riempito con 1 litro di soluzione sperimentale (Fig. 1). L'apparato era dotato di un foro centrale, collocato superiormente, nel quale veniva inserito perpendicolarmente un tubo più piccolo che permetteva l'introduzione degli animali (Fig. 1).

La sorgente luminosa era costituita da una lampada allo Xenon (150 W) collocata ad una estremità del corridoio, con fascio di luce entrante dal diametro di 20.7 mm ed intensità di 6.8 mW, mentre l'altra estremità era priva di fonti di luce. Veniva così consentita agli animali una scelta binaria o verso la luce o verso il buio. L'intensità luminosa è stata misurata al centro del corridoio utilizzando un radiometro portatile (Ophir modello NOVA, con testa di misura PD300UV) caratterizzato dalla presenza di un sensore che veniva rivolto verso il fascio di luce. Gli esperimenti sono stati effettuati al buio schermato eventuali luci parassite intorno all'apparato sperimentale.

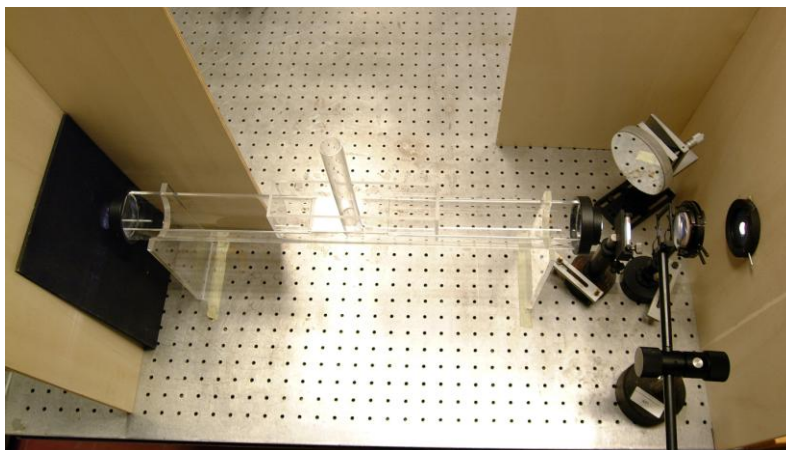


Fig. 1. Apparato sperimentale.

2.3. Esperimenti di fototassia

Sono stati svolti sia esperimenti a breve durata sia a lunga durata, per valutare l'influenza dei metalli sulla risposta fototattica dei talitri. Per entrambi i tipi di esperimenti venivano utilizzate varie soluzioni da introdurre nel corridoio:

- una soluzione di controllo costituita da acqua marina artificiale al 33 ‰,
- soluzioni di Cu, Cd e Zn.

Inoltre, negli esperimenti a breve durata, il comportamento fototattico è stato saggiato anche in acqua distillata (salinità 0 ‰) e in una soluzione di acqua marina artificiale privata del Ca^{2+} (salinità 37 ‰).

Negli esperimenti di breve durata 10 animali venivano immessi al centro dell'apparato sperimentale e mantenuti all'interno di esso per un tempo di adattamento di 10 minuti. Allo scadere del tempo di adattamento gli animali venivano rilasciati e potevano scegliere la direzione verso cui nuotare: luce, buio, o potevano rimanere al centro. Dopo 30 secondi, mediante l'inserimento di due barriere, gli animali venivano bloccati nella parte di corridoio in cui si trovavano e successivamente contati. Per ogni condizione sperimentale sono state effettuate 3 o 4 repliche per un totale di 40 animali.

Negli esperimenti a lunga durata i talitri, precedentemente esposti per 2 e 24 ore in acqua marina artificiale contaminata con Cu, Cd o Zn alla concentrazione di 1 ppm, venivano saggiati nello stesso modo descritto in precedenza ma in acqua marina artificiale non contaminata. Nella fase di pre-esposizione i talitri venivano inseriti in vaschette di plastica contenenti la soluzione sperimentale dopo essere stati posti in piccoli cilindri, sempre in plastica trasparente (lunghezza 4 cm, diametro 2.7 cm), chiusi alle estremità da una rete in poliestere a maglia fine, fissata con un elastico. Agli animali veniva

garantita una sufficiente disponibilità di ossigeno mediante ossigenatori, attivi per tutta la durata degli esperimenti. Ogni vaschetta conteneva circa 70 individui per le soluzioni di Cu, Cd, Zn e per i controlli. Anche per gli esperimenti a lunga durata sono state effettuate 3 o 4 repliche per condizione sperimentale.

Dato che l'intensità luminosa gioca un ruolo chiave sulla risposta fototattica degli organismi (si veda ad esempio Hailmann e Jaeger, 1974), prima di iniziare gli esperimenti, ho ritenuto interessante valutare la possibile influenza di questa variabile sulla risposta fototattica di *T. saltator*. Per tale motivo la risposta fototattica dei talitri è stata saggiata, oltre che a 6.8 mW, anche a 17.3, 3.0 e 0.05 mW. Questi valori sono stati ottenuti mediante l'ausilio di filtri attenuatori (3.0 e 0.05 mW) oppure in assenza di filtro (17.3 mW).

2.4. Preparazione delle soluzioni

La soluzione di controllo, costituita da acqua marina artificiale è stata preparata sciogliendo 33 g di sale marino per acquari (Tropic marine) per litro di acqua distillata con l'aiuto di un agitatore magnetico per ottenere una salinità del 33 ‰. Il sale veniva pesato mediante l'utilizzo di una bilancia analitica di precisione (Gibertini E-42). La soluzione preparata con acqua marina artificiale escluso il calcio, era costituita dai principali elementi presenti nell'acqua marina naturale (Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} , K^+) (Atkinson & Bingman, 1998). Per ottenere le stesse concentrazioni presenti nell'acqua marina naturale sono stati pesati 0,84 g di NaHCO_3 , 0,717 g di KCl, 10,16 g di MgCl_2 , 30 g di NaCl. La salinità delle soluzioni veniva controllata con un rifrattometro da campo (Salt refractometer, Sper Scientific 106 ATC, Scottsdale, AZ, USA).

Sono stati utilizzati 3 diversi tipi di sali di metalli CuCl_2 , CdCl_2 , ZnCl_2 per ottenere le concentrazioni di 1ppm, 5ppm, 10ppm di Cu, Cd e Zn ai quali esporre gli animali. Tutte le soluzioni sono state preparate per diluizione dalla soluzione a titolo maggiore (20ppm) il giorno prima degli esperimenti.

2.5. Analisi statistica

Il confronto tra le frequenze di animali fotopositivi, fotonegativi e incapaci di effettuare una scelta direzionale, osservati nelle diverse condizioni sperimentali ed il controllo, è stato effettuato tramite il G-test. L'effetto della concentrazione di ogni singolo metallo sulla risposta fotopositiva dei talitri è stato valutato mediante l'analisi della varianza non parametrica (test di Kruskal - Wallis) (Siegel e Castellan, 1988).

3. RISULTATI

I risultati mostrano che, nel range utilizzato, la risposta fototattica dei talitri non è influenzata né dall'intensità luminosa né dalla salinità e dall'assenza di Ca^{2+} (Fig. 2 A, B). Infatti, in entrambi i grafici si può notare come il numero di individui fotopositivi rimane molto alto e simile a quello registrato nei controlli (3mW vs 6.8 mW, $G = 0.91$, $df=1$, $p = \text{N.S.}$; 0.05 mW vs 6.8 mW, $G = 3.92$, $df=2$, $p = \text{N.S.}$; 17.3 mW vs 6.8 mW, $G = 0.88$, $df = 1$, $p = \text{N.S.}$, Fig. 2A) (39‰ $\text{Ca}^{2+} = 0\%$ vs 33‰ $G = 1.3$, $df=2$, $p = \text{N.S.}$; 0‰ vs 33‰ $G = 1.1$, $df=2$, $p = \text{N.S.}$ Fig. 2B).

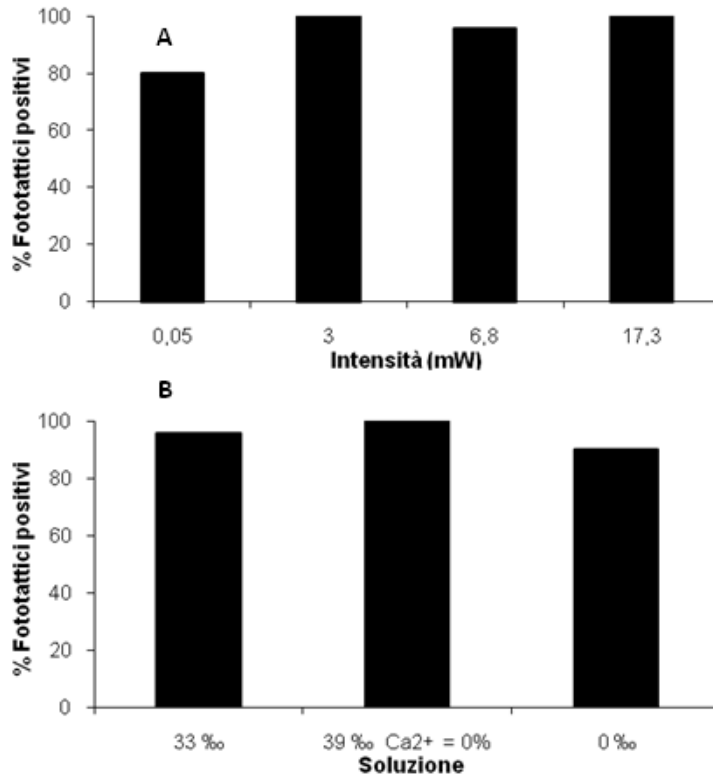


Fig. 2. Percentuale di animali fotopositivi al variare dell'intensità luminosa(A) e della salinità(B).

Negli esperimenti di breve durata effettuati con il Cu, nonostante l'analisi della varianza non parametrica risulti al limite della significatività ($H = 7.60$, $p = 0.055$., Kruskal - Wallis test), si può osservare una diminuzione della percentuale di animali fotopositivi all'aumentare della concentrazione del metallo (Fig. 3). Inoltre, la distribuzione degli animali saggiati in presenza di questo metallo risulta statisticamente differente rispetto a quella registrata nei lanci di controllo (1 ppm vs Controllo $G = 7.33$, $df = 2$, $p < 0.02$; 5 ppm vs Controllo $G = 7.94$, $df = 2$, $p < 0.02$; 10 ppm vs Controllo $G = 16.23$, $df = 2$, $p < 0.001$, G test) (Fig. 3).

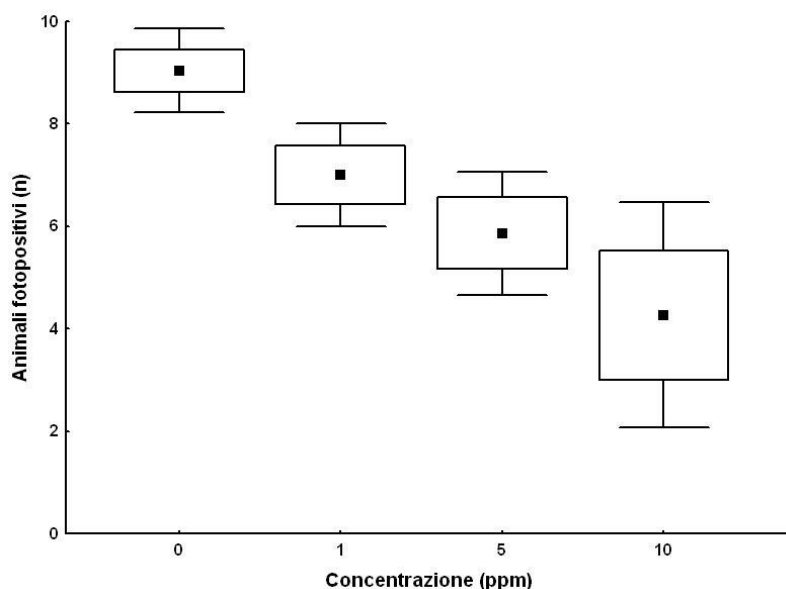


Fig. 3. Relazione tra il numero di animali fotopositivi e la concentrazione di Cu. Le scatole rappresentano il 50% dei valori, i baffi mostrano il range di variazione. Il simbolo all'interno delle scatole rappresenta la mediana.

Per quanto riguarda gli esperimenti con il Cd e lo Zn, il numero di animali fotopositivi diminuisce all'aumentare della concentrazione di esposizione sebbene questa diminuzione sia molto più evidente per gli animali esposti al Cd (Fig. 4, 5.). L'analisi della varianza non parametrica risulta significativa per il Cd e al limite della significatività per lo Zn ($H = 9.01$, $p < 0.05$ per il Cd e $H = 6.82$, $p = 0.07$ per lo Zn, Kruskal-Wallis test). La distribuzione degli animali per entrambi i metalli e per tutti i livelli di concentrazione saggiati risulta statisticamente differente rispetto al controllo (Cd 1ppm vs Controllo $G = 16.89$, $df = 2$, $p < 0.001$; Cd 5ppm vs Controllo $G = 8.90$, $df = 2$, $p < 0.02$; Cd 10ppm vs Controllo $G = 13.81$, $df = 2$, $p < 0.01$; Zn 1ppm vs Controllo $G = 7.00$, $df = 2$, $p < 0.05$; Zn 5ppm vs Controllo $G = 6.94$, $df = 2$, $p < 0.05$; Zn 10 ppm vs Controllo $G = 10.90$, $df = 2$, $p < 0.01$) (Fig. 4, 5).

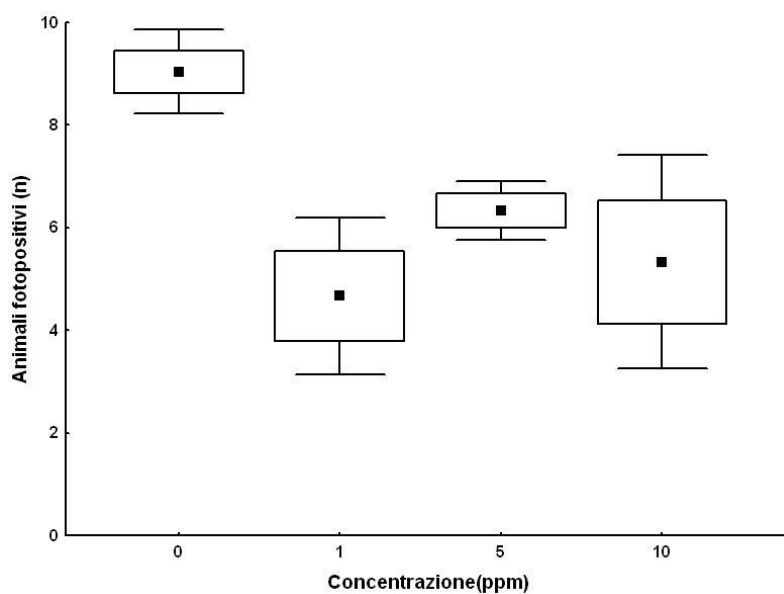


Fig. 4. Relazione tra il numero di animali fotopositivi e la concentrazione di Cd. Per ulteriori informazioni si veda la fig. 3

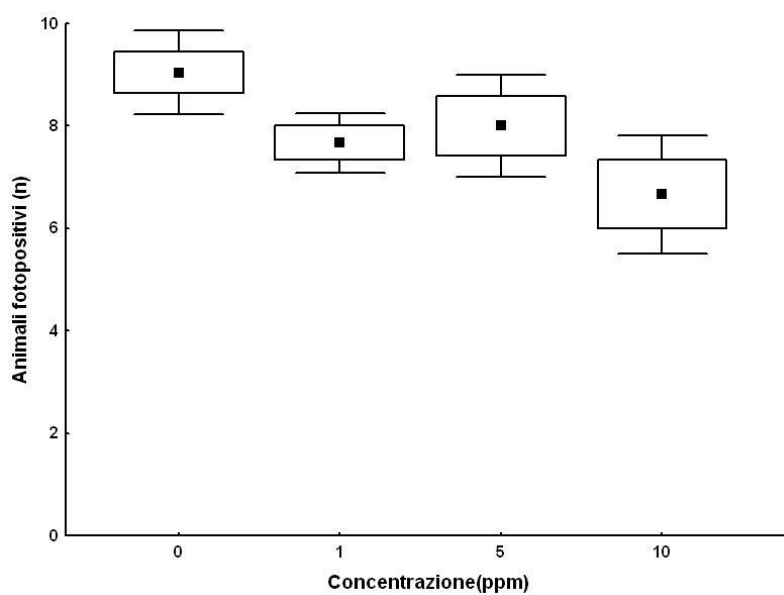


Fig. 5. Relazione tra il numero di animali fotopositivi e la concentrazione di Zn. Per ulteriori informazioni si veda la fig. 3

Negli esperimenti di lunga durata, dopo 2 ore di esposizione, si può notare una diminuzione del numero di animali fotopositivi soltanto per i talitri esposti a 1 ppm di Cu (Fig. 6.), al contrario, il numero di animali fotopositivi è analogo a quello registrato nei controlli per gli animali esposti a Cd e Zn ($H = 5.22$, $p = \text{N.S.}$, Kruskal - Wallis test). Dopo 24 ore di esposizione, è possibile notare una chiara diminuzione degli animali fotopositivi per tutti i metalli utilizzati (Fig. 7) ($H = 8.63$, $p < 0.05$, Kruskal - Wallis test).

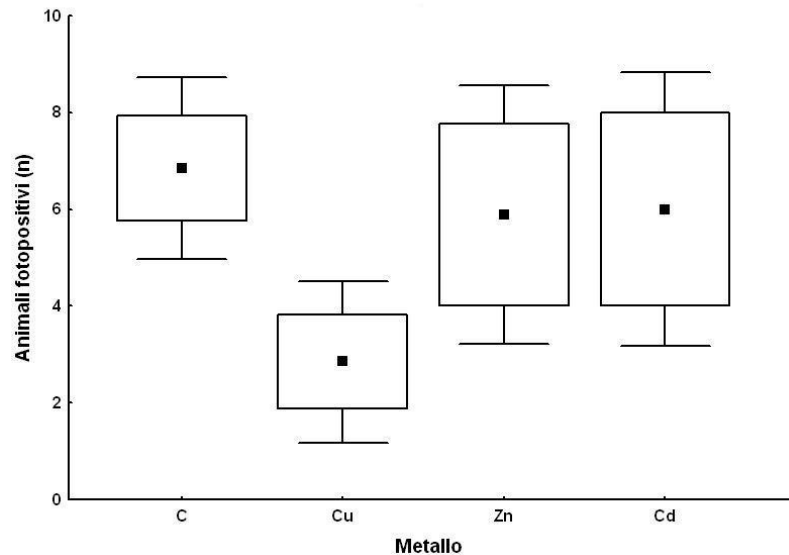


Fig. 6. Relazione tra il numero di animali fotopositivi dopo 2 ore di pre - esposizione a 1 ppm di Cu, Cd, Zn e acqua marina artificiale (C). Per ulteriori informazioni si veda la fig. 3

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Tra i possibili fattori che possono influenzare la risposta fototattica in *T. saltator* un ruolo chiave è svolto dall'intensità luminosa (Ercolini e Scapini, 1976), come dimostrato, ad esempio, anche per l'anfipode *Synchelidium micropleon* (Forward, 1986). Quindi, proprio per evitare l'introduzione di una ulteriore variabile nella sperimentazione, è stato scelto un range di intensità luminosa (0.05 – 17.3mW) per valutare il possibile effetto in *T. saltator*. I risultati non hanno mostrato variazioni significative nella percentuale di individui fotopositivi, pertanto, almeno nel range utilizzato, la risposta fototattica dei talitri non sembra dipendere dalle variazioni di intensità luminosa. Al contrario, nei test effettuati da Forward (1986) ad intensità luminose paragonabili a quelle utilizzate in questo studio, il numero di animali fotopositivi risultava inferiore rispetto a quello osservato per *T. saltator*.

Queste differenze potrebbero essere dovute, oltre a differenze specie - specifiche nella sensibilità all'intensità luminosa, anche al diverso disegno sperimentale utilizzato e, in modo particolare, ai diversi tempi di adattamento impiegati (negli esperimenti condotti su *S. micropleon* superiore a 30 minuti, nel seguente studio 10 minuti).

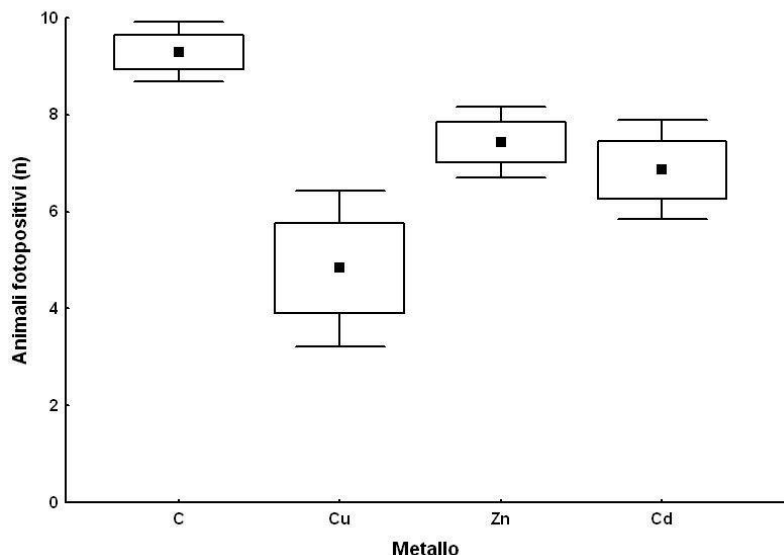


Fig. 7. Relazione tra il numero di animali fotopositivi dopo 24 ore di pre - esposizione a 1 ppm di Cu, Cd, Zn e acqua marina artificiale (C). Per ulteriori informazioni si veda la fig. 3

Per quanto riguarda i rilasci effettuati con acqua distillata e acqua marina artificiale al 33 ‰ privata del Ca^{2+} , anche in questo caso la percentuale di animali fototattici positivi risulta molto alta (mai inferiore al 90%) e simile a quella del controllo. Si può quindi dedurre che la risposta fototattica dei talitri non sembra essere influenzata da queste due variabili, contrariamente a quanto registrato per l'orientamento solare (Terracini Debenedetti, 1963; Scapini, 1979; Ugolini et al., 2009).

Dagli esperimenti effettuati con i metalli è evidente una chiara diminuzione della percentuale di animali fotopositivi, in modo concentrazione-dipendente almeno per il Cu. Questo risultato concorda con i test condotti su *D. magna* (Michels et al., 1999; 2000) e *D. carinata* (Wu et al., 2008). Infatti,

anche in queste due specie la percentuale di individui fotopositivi è negativamente correlata alla concentrazione di metalli in traccia (Michels et al., 1999; Michels et al., 2000; Wu et al., 2008).

Per quel che riguarda gli esperimenti di lunga durata, si può notare un effetto negativo dello Zn e del Cd sulla risposta fototattica di *T. saltator* soltanto a partire da 24, al contrario, per quanto riguarda il Cu, si ha una diminuzione della percentuale di animali fotopositivi sia dopo 2 ore che dopo 24 ore di esposizione. Anche test condotti su *D. magna* (Michels et al., 1999; 2000), in cui gli animali venivano esposti a basse concentrazioni di Cu, hanno evidenziato una chiara diminuzione della fotopositività già dopo rispettivamente 3.20 e 4 ore di permanenza nella soluzione contenente il metallo. Pertanto, risulta evidente che *T. saltator*, così come osservato per *D. magna* e *D. carinata* (Michels et al., 1999, 2000; Yuan et al., 2003; Martins et al., 2007, Wu et al., 2008) è in grado di percepire la presenza di Cu, Cd e Zn nel medium acquoso anche a basse concentrazioni. Inoltre, è opportuno sottolineare come, la risposta fotopositiva dei talitri diminuisce in accordo con il grado di tossicità dei metalli per *T. saltator* (Zn < Cd < Cu) (Ungherese e Ugolini, 2009). Infatti, ad esempio, dopo 24 ore di esposizione agli inquinanti, il numero più basso di animali fotopositivi è stato registrato per gli animali esposti al Cu, seguito dal Cd e dallo Zn.

È opportuno considerare, inoltre, come un effetto negativo dei metalli sulla risposta fototattica di *T. saltator* sia evidente dopo l'esposizione, per soltanto 24 ore, alla concentrazione di 1 ppm per ogni metallo. Questo valore è di gran lunga inferiore a quello registrato nei test tossicologici standard come l'LC₅₀ a 96 ore, in cui sono stati registrati valori molto più alti: 13.28 ppm per il Cu, 27.66 ppm per il Cd e 62.74 ppm per lo Zn (Ungherese Ugolini, 2009). Questo risultato conferma l'elevata sensibilità del comportamento fototattico dei talitri alla presenza di Cu, Cd e Zn nel medium acquoso rispetto ai saggi tossicologici basati sulla valutazione della mortalità.

Sebbene i meccanismi biochimici e fisiologici che sono alla base delle alterazioni prodotte dall'esposizione a Cu, Cd e Zn sulla risposta fototattica in *T. saltator* non siano note, è possibile ipotizzare due meccanismi principali:

- inibizione dell'acetilcolinesterasi (si veda ad esempio McLoughlin et al., 2000; Frasco et al., 2005) che determina effetti dannosi sulla trasmissione dei segnali nervosi.
- aumento dei costi metabolici associati alla necessità di detossificare i metalli con conseguente riduzione delle riserve energetiche necessarie per svolgere le normali attività biologiche (si veda ad esempio Amiard – Triquet, 2009).

In conclusione, in base ai risultati ottenuti è possibile concludere che il comportamento fototattico di *T. saltator* sembra essere un promettente biomarker dell'esposizione a metalli in traccia caratterizzato da un'elevata sensibilità.

6. BIBLIOGRAFIA

- Amiard – Triquet, C.** 2009. Behavioral disturbances: The missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects Based on Aquatic Research. *Human and Ecological Risk Assessment* **15** (1), 87-110.
- Atkinson, M.J. & Bingman, C.** 1998. Elemental composition of commercial seasalts. *Journal of Aquaculture*, **8**, 39-43.
- Bartolomé, M.C. & Sánchez-Fortún, S.** 2005. Acute toxicity and inhibition of phototaxis induced by benzalkonium chloride in *Artemia franciscana* larvae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **75** (6), 1208-1213.
- Blaxter, J.H.S. & Ten Hallers – Tjabbes, C.C.** 1992. The effect of pollutants on sensory systems and behavior of aquatic animals. *Netherland Journal of Aquatic Ecology*, **26** (1), 43-58.
- Ercolini, A. & Scapini, F.** 1976. Sensitivity and response to light in the laboratory of the littoral Amphipods *Talitrus saltator* Montagu. *Monitore Zoologico Italiano (N. S.)*, **10**, 293-309.
- Forward R.B., Jr.** 1988. Diel vertical migration: zooplankton photobiology and behaviour. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, **26**, 361-393.
- Fossi, M.C.** 2000. *Biomarkers: strumenti di diagnosi e prognosi ambientale*. Rosini Editrice, Firenze.
- Frasco, M.F., Fournier, D., Carvalho, F. & Guilhermino, L.** 2005. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, **10** (5), 360-375.
- Hailman, J.P. & Jaeger, R.G.** 1974. Phototactic responses to spectrally dominant stimuli and use of colour vision by adult anuran amphibians: A comparative survey. *Animal Behavior*, **22**(4), 757-795.
- Mardsen, I.D. & Rainbow, P.S.** 2004. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology - the amphipod example? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **300**, 373-408.
- Martins, J., Soares, M.L., Saker, M.L., Teles, L.O. & Vasconcelos, V.M.** 2007. Phototactic behavior in *Daphnia magna* Straus as an indicator of toxicants in the aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **67**, 417-422.
- McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R.M. & Yu, H.** 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19** (8), 2085-2092.
- Michels, E., Leynen, M., Cousyn, C., De Meester, L. & Ollevier, F.** 1999. Phototactic behavior of *Daphnia* as a tool in the continuous monitoring of

- water quality: experiments with a positively phototactic *Daphnia magna* clone. *Water Research*, **33** (2), 401-408.
- Michels, E., Semsari, S., Bin C. & De Meester, L.** 2000. Effect of sublethal doses of cadmium on the phototactic behavior of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **47**, 261-265.
- Morley, N. J., Crane, M. & Lewis, J.W.** 2003. Effects of cadmium and zinc toxicity on orientation behaviour of *Echinoparyphium recurvatum* (Digenea: Echinostomatidae) cercariae. *Diseases of Aquatic Organisms*, **56**, 89-92.
- Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Cottier, A., Rainbow, P.S. & Smith, B.D.** 2002. Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, **57**, 225-242.
- Siegel, S. & Castellan Jr. J.N.**, 1989. *Non Parametric Statistics for the Behavioral Sciences*, 2nd edition, McGraw Hill, New York.
- Scapini, F.** 1979. Orientation of *Talitrus saltator* Montagu (Crustacea Amphipoda) in fresh, sea and diluted sea water. *Monitore Zoologico Italiano (N. S.)*, **13**, 71-76.
- Scott, G.R. & Sloman, K.A.** 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, **68**, 369-392.
- Stearns, D.E. & Sharp, A.A.** 1994. Sublethal effects of cupric ion activity on the phototaxis of three calanoid copepods. *Hydrobiologia*, **292/293**, 505-511.
- Terracini Debenedetti, E.** 1963. Preliminary observations on the orientation of *Talitrus saltator* in fresh and sea water. *Naturwissenschaften*, **50**, 25-26.
- Ugolini, A., Ungherese, G., Mercatelli, L., Saer, D. & Lepri, L.** 2009. Seawater Ca²⁺ concentration influences solar orientation in *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda). *Journal of Experimental Biology*, **212**, 797-801.
- Ungherese, G. & Ugolini, A.** 2009. Sandhopper solar orientation as a behavioral biomarker of trace metals contamination. *Environmental Pollution*, **157**, 1360-1364.
- Vighi, M. & Bacci, E.** 1998. *Ecotossicologia. Trattato di tossicologia e terapia*. UTET, Torino.
- Weis, J.S., Smith, G., Bass, C.S., Zhou, T. & Weis, P.** 2001. Effects of contaminants on behaviour: biochemical mechanisms and ecological consequences. *Bioscience*, **51** (3), 209-217.
- Whitman, L.J. & Miller, R.J.** 1982. The phototactic behaviour of *Daphnia magna* as an indicator of chronic toxicity. *Proceedings of Oklahoma Academy of Science*, **62**, 22-23.

- Wu, Y., Lin, C. & Yuan, L.** 2008. Phototaxis index of *Daphnia carinata* as an indicator of joint toxicity of copper, cadmium, zinc, nitrogen and phosphorus in aqueous solutions. *Ecological Indicators*, **8**, 69-74.
- Yuan, L., Michels, E. & De Meester, L.** 2003. Changes in phototactic behaviour of *Daphnia Magna* clone C₁242 in response to copper, cadmium and pentachlorophenol. *Journal of Environmental Sciences*, **15(6)**, 841-847.

CAPITOLO 6

Sandhopper solar orientation as a behavioural biomarker of trace metals contamination

I dati presentati in questo capitolo sono stati oggetto di pubblicazione: G. Ungherese, A. Ugolini, 2009, “**Sandhopper solar orientation as a behavioural biomarker of trace metals contamination**” Environmental Pollution, Vol. 157, 1360-1364.

ABSTRACT

Although many studies have focused on trace metals accumulation, investigations of talitrid amphipods as biomarkers are rare. This study explores the possibility of using the solar orientation capacity of *Talitrus saltator* as a behavioural marker of exposure to two essential (Cu and Zn) and two non-essential (Cd and Hg) metals. LC₅₀ analyses performed before the solar orientation tests showed that the 72 h LC₅₀ for Hg was 0.02 ppm while the 96 h LC₅₀ values for Cu, Cd and Zn were 13.28 ppm, 27.66 ppm, and 62.74 ppm, respectively. The presence of metals in seawater affects the solar orientation capacity of *T. saltator* in a concentration-dependent manner and according to the toxicity ranking of the metals (Hg > Cu > Cd > Zn). Therefore, the solar orientation capacity of *T. saltator* seems to be a promising behavioural marker for exposure to trace metals.

Keywords: Amphipods, *Talitrus saltator*, Trace metals, Biomarker, Behaviour

1. INTRODUCTION

Trace metals constitute a serious threat to the natural ecosystems of coastal areas because of their persistence, toxicity, difficult biodegradation and tendency to accumulate in living organisms (Ikem and Egiebor, 2005). Many organisms have been proposed as biomonitors of heavy metals bioavailability in coastal waters (Rainbow and Phillips, 1993), including some species of supralittoral amphipods (see Marsden and Rainbow, 2004 for a review). The talitrid amphipod *Talitrus saltator* is known to accumulate Cu, Cd, Zn, Hg and also Fe and Al (Fialkowski et al., 2000, 2003; Moore and Rainbow, 1987; Rainbow and Moore, 1990; Rainbow et al., 1989, 1998; Ugolini et al., 2004, 2005, 2008). However, despite the many studies on talitrid amphipods as biomonitors of trace metals contamination, investigations of littoral amphipods as biomarkers are rare (Mouneyrac et al., 2002; Ungherese et al., 2007).

In recent years, a wide range of biological indicators have been developed to detect the exposure to contaminants and their effects. Behavioural changes associated with exposure to pollutants have recently been used for this purpose in invertebrates (e.g. the effect of Cu on locomotor behaviour of the shore crab *Carcinus maenas*, Depledge et al., 1995), since they reflect an integrative response involving complex biochemical and physiological processes (Wallace and Estephan, 2004).

Behavioural changes induced by pollutants may have a profound ecological impact on populations and communities. For example, the polycyclic aromatic hydrocarbon naphthalene disrupts pheromone-based communication during mating in the amphipod *Corophium volutator*, with possible negative consequences for reproductive success (Krång, 2007). Studies on the possible use of behavioural responses as “early warning signals” of exposure to trace metals and/or their effects have been carried out fairly recently (Roast et al., 2000, 2001; Wallace and Estephan, 2004). Some studies demonstrated that the presence of trace metals in seawater affects the swimming behaviour of amphipods (Wallace and Estephan, 2004) and mysids (Roast et al., 2000, 2001). Other studies on copper, cadmium and pharmaceuticals reported a significant reduction of locomotor activity of the amphipod *Gammarus pulex* (De Lange et al., 2006; Felten et al., 2008; Mills et al., 2006).

The sandhopper *T. saltator* is well known for its ability to use the sun and moon as compass cues to return to the damp belt of sand in which it remains buried during the day (see Pardi and Ercolini, 1986 for a review). It uses this orientation mechanism to return to the wet sand following the shortest path, i.e. the Y-axis (sea-land) of its home beach. In fact, sandhoppers assume a seaward direction if dehydrated and a landward direction if in the water. The quick landward response is mainly to avoid the risk of predation by fishes rather than to escape from physical stress (Ugolini, 1989; Ugolini, 1996a,b).

Solar orientation is a well-known behavioural response that can easily be assessed and quantified in a controlled setting. Since solar orientation is

important for *T. saltator* to return to its ecological optimum, any disruption of the mechanism could have serious consequences for sandhopper survival. Therefore, we assessed sandhopper solar orientation capacity as a biomarker of exposure to two essential (copper and zinc) and two non-essential (cadmium and mercury) heavy metals. Since there are no data on the sensitivity of this species to these metals, we performed an acute toxicity test (LC_{50}) before carrying out the behavioural tests.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Collection and maintenance

We used adult individuals of *T. saltator* collected not more than 15 days earlier on a sandy beach in Tuscany (Fiume Morto Vecchio, Regional Natural Park of Migliarino San Rossore Massaciuccoli, Pisa, Italy). The sea–land axis of the beach is 84–264°. In the laboratory, sandhoppers were kept in plastic containers with wet sand and were fed weekly with dry fish food and blotting paper. The animals were subjected to an artificial light cycle corresponding in phase and duration to the natural one. There was no artificial dusk or dawn. Daytime illumination was provided by neon tubes (light intensity 65 mW/cm²).

2.2 LC_{50}

The saline solutions used in the trials were prepared 24 h before each test by dissolving an appropriate quantity of artificial sea salt (Tropic Marin Sea Salt, Wartenberg, Germany) in double-distilled water using a magnetic stirrer. The saline concentration used in each experiment was 33‰ and was checked with a hand refractometer (Salt refractometer Sper Scientific 106 ATC, Scottsdale, Arizona).

Sandhoppers were randomly assigned to different experimental groups ($n = 20$), each exposed to different concentrations of metals. The test was conducted at 14.5 ± 1 °C and under a 12 h photoperiod (corresponding to the natural one). Two separate replicates were performed, with ten animals in each group. Each group was placed in aerated tanks to maintain a good level of dissolved oxygen. Nominal exposure concentrations were: 0.01, 0.05, 0.1, 1 and 2 ppm for mercury; 1, 5, 10 and 15 ppm for copper; 3, 7.5, 10, 15, 20 and 40 ppm for cadmium; and 5, 10, 20, 50 and 100 ppm for zinc. These solutions were prepared by serial dilution from a stock solution of each toxicant ($HgCl_2$, $CuCl_2$, $ZnCl_2$ and $CdCl_2$) at 33 ‰ salinity. The control was artificial seawater alone. The test ran for 96 h for Cu, Cd and Zn. For the Hg it was impossible to reach the 96 h: e.g., at 0.05 of concentration, 80% of sandhoppers was dead. Therefore, the LC_{50} was calculated at 72 h. The amphipods were not provided with additional food, and the mortality was recorded daily. At the end of the exposure time, individuals that did not show any movement after mechanical stimulation were considered dead.

2.3. Solar orientation

Tests of solar orientation capacity were carried out by releasing adult individuals of *T. saltator* in artificial seawater with 0.5, 1, 5 and 10 ppm of one of the following trace metals: Hg, Cu, Cd, and Zn. Tests were carried out in a confined environment using an experimental apparatus similar to the one employed by Pardi and Papi (1952) slightly modified (see Ugolini and Macchi, 1988). Sandhoppers were released in a transparent Plexiglas bowl (15 cm in diameter) with 2 cm of seawater. The bowl was placed on a transparent plate so that the animals could be observed from below. The bowl and plate were placed on a tripod and surrounded by a white Plexiglas screen (3 cm higher than the water level) to prevent vision of the landscape. Sandhoppers were released directly in test solutions in groups of about 10 individuals at a time under the sun and blue sky around midday. Since the sandhoppers were released in water, the expected direction of orientation was 84° (= landward direction of the sea-land axis of their home beach). Only one direction for each individual was recorded (after 5 min of permanence in the solution) by a freeze-frame image using a video camera placed under the bowl. Test solutions were prepared using artificial seawater (33‰ salinity) with the addition of one of the metals (HgCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 and CdCl_2) to obtain four solutions at the nominal concentrations of 0.5, 1, 5 and 10 ppm for each metal. The control was artificial seawater alone.

2.4. Statistical analysis

LC_{50} and 95% confidence limits (CLs) were determined by the trimmed Spearman–Kärber method (Hamilton et al., 1977). Elaboration of circular data and statistical analyses were carried out by the methods of circular statistics (Batschelet, 1981). For each circular distribution, the length of the mean resultant vector and the mean angle were calculated. The Rao test was applied to assess whether the distribution was different from uniformity. Furthermore, for each distribution we calculated the “goodness of orientation” (GO) (see Batschelet, 1981, pp. 40–42):

$$\text{GO} = r \cos (\text{TED} - \alpha)$$

where r is the mean vector length, TED is the theoretical escape direction (in our case 84°) and α is the mean angle. The GO value ranges from 1 (perfect orientation) to -1 (opposite orientation) passing through 0 (uniform distribution).

3. RESULTS

The LC_{50} curves show that the survival rate of controls was always high ($>90\%$), whereas survival decreased with increasing concentrations of Hg, Cu, Cd and Zn (Fig. 1).

The 72 h LC₅₀ for Hg was 0.02 ppm (CL = 0.01–0.04) while the 96 h LC₅₀ values for Cu, Cd and Zn were 13.28 ppm (CL = 10.7–16.5), 27.66 ppm (CL = 16.6–46.0) and 62.74 ppm (CL = 32.8–120.1), respectively.

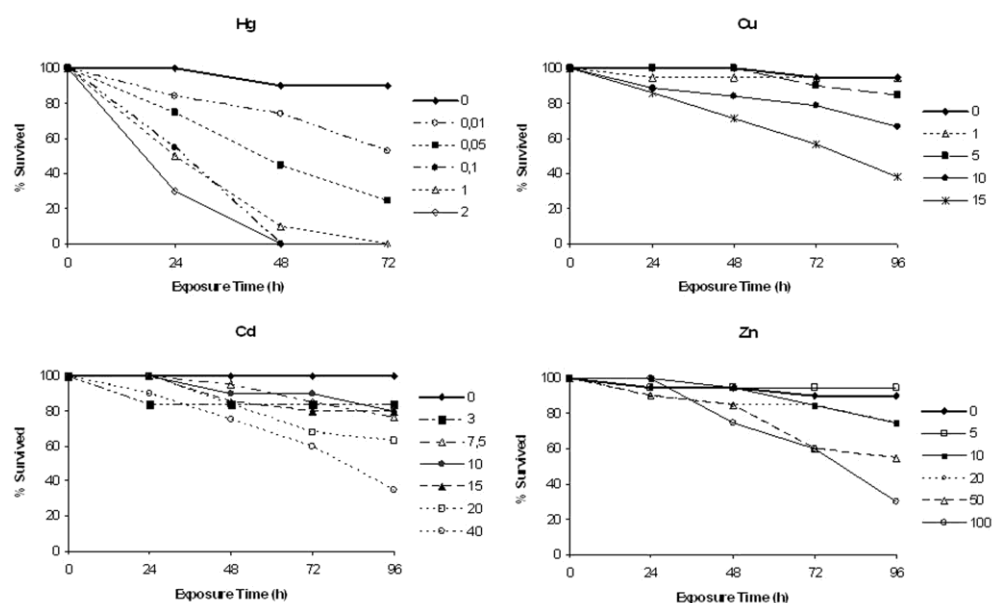


Fig. 1. Survival rate of *T. saltator* exposed to different concentrations of metals in LC₅₀ tests. The lines indicate the survival rate at each nominal metal concentration. The legend near each graph gives the metals concentrations (ppm).

The solar orientation results (Fig. 2) clearly show that the distributions of control individuals tested in pure artificial seawater were significantly different from uniformity and the mean vectors pointed toward the expected direction (max difference = 6°).

With Hg in the seawater (Fig. 2), the sandhoppers were able to orient in the correct direction till a concentration of 0.5 ppm. Above this concentration, the circular distributions were not statistically significant.

The same was true for Cu (Fig. 2), although in this case the sandhoppers' directions were uniformly distributed starting from a concentration of 5 ppm.

The results for the non-essential Cd and the essential Zn (Fig. 2) were similar to each other but differed from those for Hg and Cu. In both cases, there were no significantly uniform circular distributions (Fig. 2). However, the GO curves show a clear tendency to a sharp decrease between 0.5 and 5.0 ppm for Hg, Cu, and a more gradual decrease for Cd and Zn (Fig. 3).

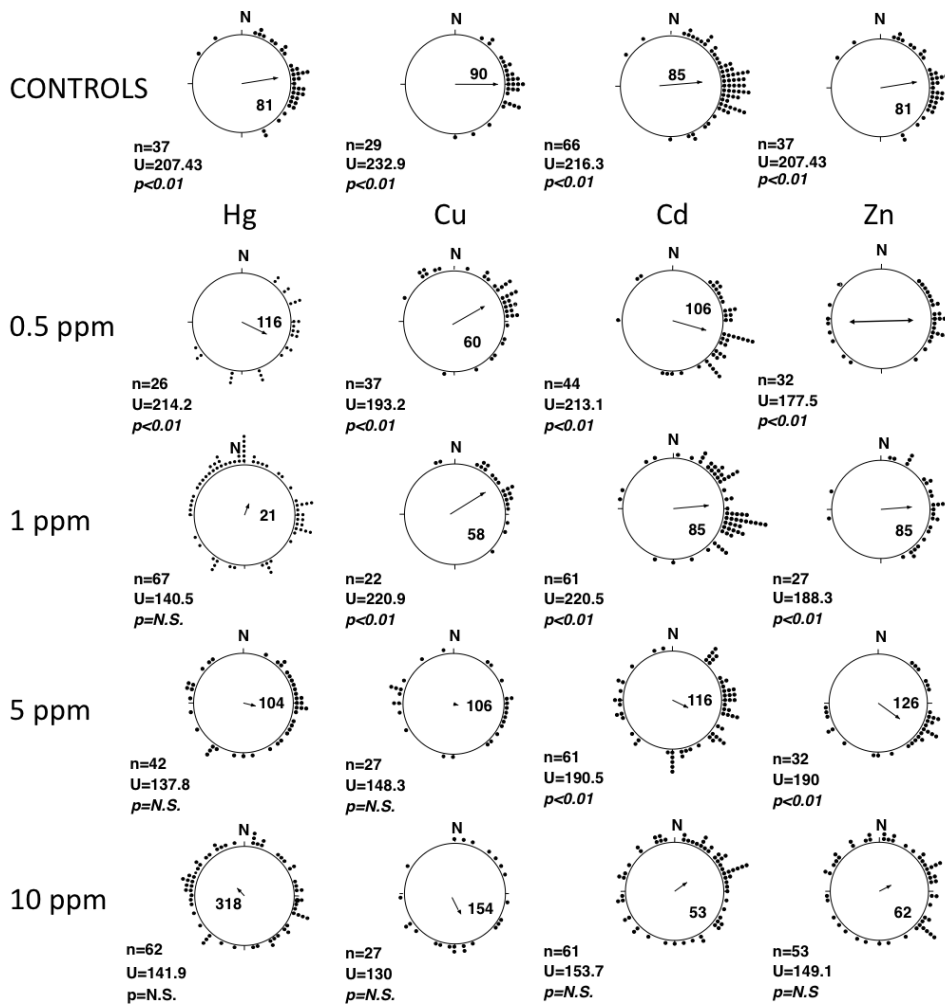


Fig. 2. Solar orientation test. The arrow inside each distribution represents the mean vector with the mean angle; dots, sandhopper directions (each dot represents one individual); N, magnetic north. In each distribution, the number of samples n and the Rao test value U with probability level p are also reported.

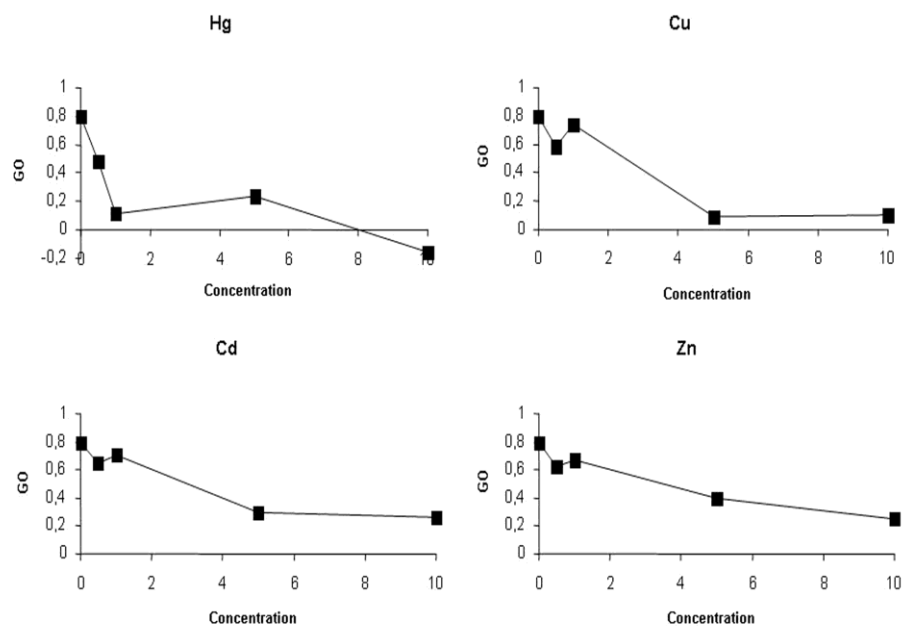


Fig. 3. Goodness of orientation (GO) values for each concentration of the metals. See Section 2.4 for further explanations.

4. DISCUSSION

There is no information about the toxicity of metals to *T. saltator*, even though many studies have focused on trace metals accumulation in this species (Fialkowski et al., 2000, 2003; Rainbow and Moore, 1990; Rainbow et al., 1989, 1998; Ugolini et al., 2004, 2005, 2008). The only data on talitrid amphipods are those of Mouneyrac et al. (2002) concerning *Orchestia gammarellus*. After 17 days of exposure to Cu and Zn, Cu was more toxic than Zn. Therefore, our LC50 results agree with those reported for *O. gammarellus* and other species of amphipods (e.g. *Echinogammarus tibaldi*, Pantani et al., 1997). In fact, the toxicity ranking of metals for *T. saltator* is Zn < Cd < Cu < Hg.

Our results are obviously not conclusive regarding the possibility to use the sun compass capacity of sandhoppers as a behavioural biomarker in biomonitoring programmes. However, they demonstrate that the ability to orient in the ecologically correct direction depends on the trace metal used and its concentration in the seawater. We do not know why sandhoppers cannot choose the ecologically correct direction in the experimental conditions used, but we can formulate the following hypotheses: (1) the pollutant could act on one or both components of the sun compass mechanism (i.e. the reference direction and/or the chronometric mechanism for sun compensation); or (2) the presence

of the pollutant could simply act as an aspecific disturbance, making the seawater a highly stressful medium. The latter hypothesis is weakened, however, by the fact that sandhoppers not only accumulate Hg, Cu, Cd and Zn (Hg max 0.47 ppm, Cu max 87.7 ppm, Ugolini et al., 2004, 2008; Cd max 35.1 ppm, Zn max 262 ppm, Rainbow et al., 1989, 1998) but can survive in polluted sites with very high concentrations in sediments, e.g. 43.6 ppm of Cu for sites where *T. saltator* lives (Ugolini et al., 2004) and up to 2540 ppm of Cu for localities with other talitrid species (*O. gammarellus*, Rainbow et al., 1989).

About the ecological relevance of our study, it is obvious that further investigations are needed since the metals concentrations used in our tests could be considered quite high. However, it should be taken in account also that the microhabitat in which the sandhopper spend the most part of the day is the supralittoral damp sand, and it is actually known that the presence of many type of pollutants are much more concentrated in the sediment than in the seawater.

5. CONCLUSIONS

Our findings show that the solar orientation capacity of *T. saltator*, a well-known behavioural response that can be easily assessed and quantified in a controlled setting, is affected negatively by the presence of trace metals in seawater (Hg, Cu, Cd and Zn) in a dose-dependent way and according to the toxicity ranking of metals. Therefore, the solar orientation capacity of *T. saltator* is a promising behavioural marker for exposure to trace metals contamination. On the other hand, trace metals contamination of littoral (intertidal) environments could imperil the survival of sandhoppers since they cannot use one of their two principal orientation mechanisms that allow them to return to the band of damp sand following the shortest route: vision of the landscape and astronomical orientation (Pardi and Ercolini, 1986; Ugolini et al., 1988, 2006; Ugolini and Cannicci, 1991).

Acknowledgements

The research was funded by the Fondazione Monte dei Paschi (Siena) (Grant 31017).

6. REFERENCES

- Batschelet, E.** 1981. *Circular Statistics in Biology*. Academic Press, London, New York.
- De Lange, H.J., Noordoven, W., Murk, A.J., Lürling, M. & Peeters, E.T.H.M.** 2006. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, **78**, 209–216.

- Depledge, M.H., Aagaard, A. & Györkös, P.** 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin*, **31**, 19–27.
- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J. & Geffard, O.** 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology*, **86**, 413–425.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Fialkowska, E. & Smith, B.D.** 2000. Biomonitoring of trace metals along the Baltic Coast of Poland using the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea: Amphipoda). *Ophelia*, **52**, 183–192.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Smith, B.D. & Zmudzinski, L.** 2003. Seasonal variation in trace metal concentrations in three talitrid amphipods from the Gulf of Gdansk, Poland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **288**, 81–93.
- Hamilton, M.A., Russo, R.L. & Thurston, R.V.** 1977. Trimmed Spearman–Kärber method for estimating median lethal concentrations. *Environmental Science and Technology*, **11**, 714–719.
- Ikem, A. & Egiebor, N.O.** 2005. Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**, 771–787.
- Krång, A.S.** 2007. Naphthalene disrupts pheromone induced mate search in the amphipod *Corophium volutator* (Pallas). *Aquatic Toxicology*, **85**, 9–18.
- Mardsen, I.D. & Rainbow, P.S.** 2004. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology - the amphipod example? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **300**, 373–408.
- Mills, C.L., Shukla, D.H. & Compton, G.J.** 2006. Development of a new low cost high sensitivity system for behavioural ecotoxicity testing. *Aquatic Toxicology*, **77**, 197–201.
- Moore, P.G. & Rainbow, P.S.** 1987. Copper and zinc in an ecological series of talitroidean Amphipoda (Crustacea). *Oecologia*, **73**, 120–126.
- Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Cottier, A., Rainbow, P.S. & Smith, B.D.** 2002. Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, **57**, 225–242.
- Pantani, C., Pannunzio, G., De Cristofori, M., Novelli, A.A. & Salvatori, M.** 1997. Comparative acute toxicity of some pesticides, metals, and surfactants to *Gammarus italicus* Goedm. and *Echinogammarus tibaldii* Pink. and Stock (Crustacea: Amphipoda). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **59**, 963–967.
- Pardi, L. & Ercolini, A.** 1986. Zonal recovery mechanisms in talitrid crustaceans. *Bollettino di Zoologia*, **53**, 139–160.

- Pardi, L. & Papi, F.** 1952. Die sonne als kompass bei *Talitrus saltator*. *Naturwissenschaften*, **39**, 262–263.
- Rainbow, P.S. & Moore, P.G.** 1990. Seasonal variation in copper and zinc in three talitrid amphipod (Crustacea). *Hydrobiologia*, **196**, 65–72.
- Rainbow, P.S. & Phillips, D.J.H.** 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*, **26**, 593–601.
- Rainbow, P.S., Moore, P.G. & Watson, D.** 1989. Talitrid amphipods (Crustacea) as biomonitors for copper and zinc. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **28**, 567–582.
- Rainbow, P.S., Fialkowski, W. & Smith, B.D.** 1998. The sandhopper *Talitrus saltator* as a trace metal biomonitor in the Gulf of Gdansk, Poland. *Marine Pollution Bulletin*, **36**, 193–200.
- Roast, S.D., Widdows, J. & Jones, M.B.** 2000. Mysids and trace metals: disruption of swimming as a behavioural indicator of environmental contamination. *Marine Environmental Research*, **50**, 107–112.
- Roast, S.D., Widdows, J. & Jones, M.B.** 2001. Impairment of mysid (*Neomysis integer*) swimming ability: an environmentally realistic assessment of the impact of cadmium exposure. *Aquatic Toxicology*, **52**, 217–227.
- Ugolini, A.** 1989. Orientation in the water and antipredatory behaviour in sandhoppers. *Marine Behavior and Physiology*, **14**, 223–230.
- Ugolini, A.** 1996a. Crypsis and behaviour in sandhoppers: antipredator effectiveness in the water. *Ethology*, **103**, 41–46.
- Ugolini, A.** 1996b. Jumping and sun compass in sandhoppers: an antipredator interpretation. *Ethology Ecology and Evolution*, **8**, 97–106.
- Ugolini, A. & Cannicci, S.** 1991. Solar orientation in British sandhoppers. *Marine Behavior and Physiology*, **19**, 149–157.
- Ugolini, A. & Macchi, T.** 1988. Learned component in the solar orientation of *Talitrus saltator* Montagu (Amphipoda: Talitridae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **121**, 79–87.
- Ugolini, A., Scapini, F., Beugnon, G. & Pardi, L.** 1988. Learning in zonal orientation of sandhoppers. In: *Behavioural Adaptation to Intertidal Life*. (Ed. by G., Chelazzi & M., Vannini) pp. 115–118. NATO ASI Series A, **151**. Plenum Press, New York.
- Ugolini, A., Borghini, F., Calosi, P., Bazzicalupo, M., Chelazzi, G. & Focardi, S.** 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 526–532.
- Ugolini, A., Borghini, F., Focardi, S. & Chelazzi, G.** 2005. Heavy metals accumulation in two syntopic sandhopper species: *Talitrus saltator* (Montagu) and *Talorchestia ugoi* (Bellan Santini and Ruffo). *Marine Pollution Bulletin*, **50**, 1328–1334.
- Ugolini, A., Somigli, S. & Mercatelli, L.** 2006. Green land and blue sea: a coloured landscape in the orientation of the sandhopper *Talitrus saltator*

- (Montagu) (Amphipoda, Talitridae). *Journal of Experimental Biology*, **209**, 2509–2514.
- Ugolini, A., Ungherese, G., Somigli, S., Galanti, G., Baroni, D., Borghini, F., Cipriani, N., Nebbiai, M., Passaponti, M. & Focardi, S.** 2008. The amphipod *Talitrus saltator* as a bioindicator of human trampling on sandy beaches. *Marine Environmental Research*, **65**, 349–357.
- Ungherese, G., Baroni, D., Bruni, P., Focardi, S. & Ugolini, A.** 2007. Esposizione al rame e concentrazione di metallotioneine in *Talitrus saltator*. *Biologia Marina Mediterranea*, **14** (2), 414–415 (In Italian).
- Wallace, W.G. & Estephan, A.** 2004. Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a gammaridean amphipod (*Gammarus lawrencianus*). *Aquatic Toxicology*, **69**, 289–297

CAPITOLO 7

Esposizione a metalli in traccia e attività locomotoria in *Talitrus saltator* (Montagu) (Amphipoda, Talitridae).

I risultati presentati nel seguente capitolo sono stati ottenuti in collaborazione con il Dott. Matteo Salvadori, il Dott. Davide Baroni (Dip. Scienze Ambientali, Università di Siena), il Dott. Vittorio Pasquali (Dipartimento di Psicologia, Università di Roma “La Sapienza”), Prof. A. Ugolini.

1. INTRODUZIONE

Il controllo dell'organizzazione spaziale e temporale dell'attività costituisce un elemento chiave per la maggior parte delle specie animali e contribuisce in maniera determinante alla fitness individuale. Per quanto riguarda gli invertebrati, sono noti diversi casi di effetti sul comportamento spazio-temporale, indotti dalla esposizione, ad esempio, a metalli in traccia (si veda Amiard – Triquet, 2009 per una revisione). Alcune ricerche hanno dimostrato una riduzione della capacità di nuotare nel misidiaceo *Neomysis niger* esposto al Cd e a pesticidi organofosforici impedendo così il mantenimento dell'optimum ecologico (Roast et al., 2000, 2001). Altre ricerche hanno dimostrato il notevole impatto, prodotto da alcuni metalli pesanti, sulla capacità di nuotare in numerose specie di Anfipodi (Lawrence e Poulter, 1996; Wallace and Estephan, 2004) e di catturare le prede in Decapodi (Perez and Wallace; 2004). Studi condotti sull'anfipode *Gammarus pulex* hanno dimostrato una notevole riduzione dell'attività locomotoria, in modo concentrazione dipendente, in risposta al Cu (Mills et al., 2006). Tuttavia, al contrario dei risultati degli studi precedenti, anfipodi appartenenti alla specie *Corophium volutator* esposti a differenti concentrazioni del biocida Bioban mostravano un aumento dell'attività locomotoria (Kirkpatrick et al., 2006). Questo tipo di risposta è stata riscontrata anche in *G. pulex* esposto a differenti concentrazioni di prodotti farmaceutici (Fluoxentina, Ibuprofene, Carbamazepine) (De Lange et al., 2006). L'incremento dell'attività locomotoria mostrato in questi studi rappresenta, probabilmente, un tentativo di fuga o evitamento di una condizione ambientale sfavorevole (Kirkpatrick et al., 2006).

L'anfipode *Talitrus saltator* rappresenta un modello biologico interessante per l'analisi dell'effetto dei contaminanti sul comportamento spaziale. In particolare, il ritmo di attività locomotoria di questa specie è noto e ben studiato (si veda Ugolini, 2003 per una revisione). *T. saltator*, come altri organismi litorali, deve far fronte a periodiche e aperiodiche fluttuazioni di fattori biotici e abiotici che caratterizzano l'ambiente in cui vive. Per evitare condizioni ambientali svantaggiose *T. saltator* presenta un ritmo di attività endogeno circadiano con periodicità notturna ben definita come dimostrano gli studi condotti da Bregazzi e Naylor (1972) e Naylor (1988) in condizioni costanti (oscurità o presenza di luce rossa soffusa). Infatti, i talitri sono attivi principalmente nelle ore notturne, quando le condizioni di temperatura ed umidità sono più favorevoli allo svolgimento delle attività biologiche, invece, durante il giorno rimangono infossati nei rifugi scavati nella sabbia umida per evitare il rischio di disseccamento e predazione (Geppetti e Tongiorgi, 1967; Rüppel, 1967; Wildish, 1988, Scapini et al., 1992; Williams, 1995). Tuttavia *T. saltator* può essere attivo anche durante il giorno in presenza di fattori non periodici come la pioggia o mareggiate (Geppetti e Tongiorgi, 1967; Scapini et al., 1992; 1997). Contrariamente a quanto osservato in numerosi organismi intertidali (Herrnkind, 1983; Palmer, 1995), il ritmo di attività dei talitri è

indipendente dal ritmo tidale ed è regolato, principalmente, dall'alternanza luce buio e dall'ora dell'alba (Ercolini, 1960; Williams, 1980b, c). Sebbene alcune ricerche abbiano evidenziato che l'esposizione prolungata a basse temperature (2 - 6°C) può influenzare l'attività locomotoria (Pardi e Grassi 1955; Bregazzi, 1972), variazioni di temperatura nel range osservabile in natura non influenzano l'attività locomotoria in *T. saltator* (Williams, 1980a). Inoltre, ricerche recenti (Nardi et al., 2003) hanno evidenziato differenze stagionali nella definizione e nella periodicità del ritmo di attività dei talitri con un decremento nei mesi invernali rispetto ai mesi estivi.

Recentemente sono state messe a punto numerose metodologie per rilevare l'attività locomotoria di animali di piccole dimensioni mediante rilevatori ad infrarosso (Mills et al., 2006), elettrodi che generano corrente alternata ad alta frequenza (Gerhardt et al., 1995) e radar a microonde (Pasquali e Renzi, 2005). Quest'ultima tecnica è stata utilizzata per valutare l'eventuale relazione tra ritmo di attività e bussola solare in *T. saltator* (Ugolini et al., 2007).

Nonostante numerose ricerche si siano concentrate sull'influenza di numerosi fattori abiotici sul ritmo di attività dei talitri (si veda Ugolini, 2003 per una revisione), le ricerche riguardanti la possibile influenza dell'esposizione a contaminanti sulla distribuzione temporale dell'attività locomotoria in *T. saltator* sono assenti.

Tra le diverse risposte messe in atto dagli anfipodi in risposta alla contaminazione ambientale, una delle più studiate è senza dubbio il comportamento di evitamento di substrato (Erdem e Meadows, 1980), per cui tramite questo tipo di indagini comportamentali si possono ottenere informazioni riguardo la presenza di contaminanti nell'ambiente. Erdem e Meadows (1980) hanno dimostrato una forte percentuale di evitamento di substrati contaminati con differenti concentrazioni di Hg (0,001, 0,1, 10, 1000 ppm) rispetto a substrati non contaminati nell'anfipode *C. volutator*. Risultati analoghi sono stati ottenuti per la stessa specie in presenza di differenti concentrazioni di Cu (comprese tra 10 e 48 ppm), Cd (comprese tra 2 e 102 ppm) e Zn (comprese tra 20 e 95 ppm) (Bat e Raffaelli, 1998) e IPA (Hellou et al., 2005).

Lo scopo di questo studio è di valutare la possibile influenza dell'esposizione a metalli in traccia nel sedimento (Hg, Cu e Cd) sul ritmo di attività locomotoria e sul comportamento di evitamento di substrato in *T. saltator*. Tuttavia, nonostante *T. saltator* viva in stretto contatto con il substrato e possa probabilmente ingerire, insieme al cibo, particelle di sabbia, le ricerche riguardanti la possibile importanza del sedimento come fonte di metalli in traccia sono quasi assenti (Marsden e Rainbow, 2004). Per tale motivo ho ritenuto interessante indagare circa l'eventuale importanza del sedimento come fonte di metalli assimilabili nei talitri.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Allevamento e raccolta

Gli esperimenti sono stati condotti su esemplari adulti di *T. saltator* raccolti nel periodo compreso tra Giugno e Dicembre 2008 in località Fiume Morto Vecchio (Parco Regionale di Migliarino, S.Rossore, Massaciuccoli, Pisa). Una volta trasportati in laboratorio, gli animali venivano trasferiti in vaschette di plexiglas, all'interno delle quali era stata precedentemente inserita della sabbia umidificata con dell'acqua marina naturale diluita. Gli anfipodi venivano nutriti due volte a settimana con mangime secco per pesci (Sera Vipar) posto su quadrati di carta assorbente. In laboratorio la temperatura era mantenuta a 24°C e l'illuminazione era fornita da lampade al neon collegate a un timer che ne regolava l'accensione secondo un ritmo luce:buio corrispondente in fase e durata con quello naturale.

2.2. Apparato Sperimentale

2.2.1 Misura del ritmo di attività

Per il controllo del ritmo di attività degli animali sono stati utilizzati radar a microonde (Fig. 1), grazie ad un sistema recentemente sviluppato per il rilevamento dell'attività locomotoria di animali di piccole dimensioni (Pasquali e Renzi, 2005). La frequenza su cui opera il radar è in diretto rapporto con la capacità di rilevamento del radar, l'oggetto target deve essere di dimensioni vicine alla lunghezza d'onda. L'apparato utilizzato opera sulla frequenza di 12 Ghz, cioè una lunghezza d'onda di 3 cm, quindi con una marcata sensibilità nell'utilizzo con soggetti di circa 3 cm; ciò nonostante grazie alle modifiche apportate è stato possibile adattare gli apparati al fine di rilevare il movimento dei talitri le cui dimensioni nel caso degli adulti sono di circa 0,5-1 cm.

Il rilevamento del movimento veniva effettuato in modo automatico prelevando il segnale dal pin d'ingresso del processore deputato al controllo dell'elaborazione e successiva attivazione del segnale d'allarme. Da quel punto infatti veniva prelevato l'impulso elettrico che, tramite scheda di input/output digitale, veniva letto da un computer. Un software appositamente scritto in linguaggio C permetteva la lettura dei segnali provenienti dai diversi radar collegati ai 10 canali della scheda e memorizzati successivamente nel computer (Pasquali, 2006). Attraverso il software era possibile controllare sia i diversi parametri per la memorizzazione dei dati (frequenza di lettura del canale, intervallo di emissione record, lunghezza dell'esperimento) che la sensibilità della strumentazione.

2.2.2. Scelta binaria

L'apparato sperimentale era costituito da un cilindro di plexiglas (20 cm di diametro, 10 cm di altezza) munito di coperchio di plexiglas opalino. L'interno presentava un setto divisorio (altezza 3 cm), posto in corrispondenza del diametro. I due compartimenti venivano riempiti con la stessa quantità di

sabbia (una contaminata con il metallo, l'altra non contaminata) in modo da raggiungere l'altezza dell'asse divisorio, consentendo, così, ai talitri di muoversi liberamente all'interno della ciotola (Fig. 2)

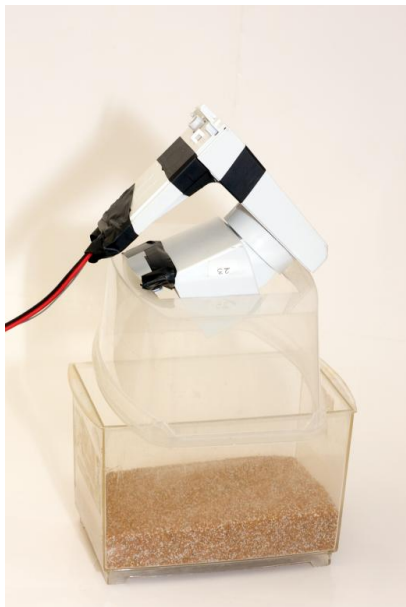


Fig. 1. Radar e vaschetta sottostante dove venivano collocati gli animali per lo studio del ritmo di attività locomotoria.



Fig. 2. Apparato sperimentale usato per la scelta del substrato.

2.3. Esperimenti effettuati

Sia i saggi volti a misurare il ritmo di attività, sia quelli sulla scelta del substrato sono stati effettuati in una cella termostatica con temperatura costante 20 ± 1 °C, e un'illuminazione con ritmo L:D 12:12 (alba: ore 06.00; tramonto: ore 18.00). Gli animali venivano posti all'interno della cella il giorno prima rispetto alla data di inizio dell'esperimento in modo da permetterne l'acclimatazione alle condizioni sperimentali.

2.3.1 Ritmo di attività

All'interno della cella sono state collocate due vaschette di plastica (17 x 11 x 12), la prima contenente 1 kg di sabbia non contaminata (controllo), la seconda invece 1 kg di sabbia contaminata (sperimentale). In entrambe, successivamente, venivano inseriti del cibo sopra un ritaglio di carta assorbente e 15 individui adulti. Una volta introdotti gli anfipodi, le vaschette sono state chiuse con un foglio di pellicola trasparente, sopra il quale veniva posizionato il radar distanziato dalla superficie della sabbia di 16 cm (Fig. 1). La sabbia della vaschetta di controllo veniva umidificata con piccole quantità di acqua marina artificiale, la sperimentale con un quantitativo variabile di soluzione contenente il metallo in aggiunta ad acqua marina artificiale, in modo da raggiungere lo stesso quantitativo presente nel controllo. Per i metalli sono state utilizzate le seguenti concentrazioni: 0,37 ppm e 0,66 ppm per Hg, 0,5 e 1,0 per Cd e 10 ppm e 20 ppm per il Cu. Le concentrazioni di Hg, Cu e Cd sono state scelte sulla base dei dati presenti in letteratura riguardanti la costa toscana (Ugolini et al., 2004, 2008). La registrazione dei dati riguardanti l'attività iniziava dopo 24 ore di acclimatazione degli animali alle condizioni sperimentali e la sopravvivenza dei talitri veniva controllata al termine del primo, terzo e settimo giorno di registrazione. Alla fine del test gli animali sopravvissuti venivano raccolti e immediatamente congelati per effettuare le analisi del contenuto di Hg, Cu e Cd.

2.3.2. Scelta binaria

Le due metà venivano del cilindro di plexiglas venivano riempite con 650 g di sabbia artificiale, una umidificata con 65 ml di acqua marina artificiale (parte non contaminata), la seconda umidificata con 65 ml di soluzione di acqua marina artificiale contenente Cu, Cd o Hg in modo da ottenere le stesse concentrazioni utilizzate negli esperimenti per misurare il ritmo di attività. Per ogni test venivano introdotti 10 animali adulti e, successivamente la ciotola veniva chiusa con il coperchio di plexiglas opalino. Dopo 24 ore dall'inizio dell'esperimento, venivano contati gli animali infossati in ognuna delle due metà della ciotola, mentre i talitri in superficie non venivano considerati nel conteggio. Sono state effettuate, inoltre, prove utilizzando sabbia non contaminata per entrambi le metà, per valutare possibili disomogeneità del sistema che potevano influenzare la scelta dei talitri.

2.4. Preparazione delle soluzioni

La soluzione di controllo era costituita da acqua marina artificiale al 33‰, ottenuta sciogliendo 33g di sale marino per acquari (Tropic Marine sea salt) per 1 L di acqua distillata. Il sale veniva pesato mediante l'utilizzo di una bilancia analitica di precisione, mentre la salinità dell'acqua veniva verificata utilizzando un rifrattometro da campo (Salt refractometer Sper Scientific 106 ATC). La soluzione ottenuta, costituita dai principali elementi e nelle stesse concentrazioni presenti in natura, veniva infine travasata in bottiglie da 0,5 L e trasferita nella cella termostatica.

Nei giorni precedenti alla data dell'esperimento venivano preparate le soluzioni contenenti Hg, Cd, o Cu, utilizzando i rispettivi sali (HgCl_2 , CdCl_2 o CuCl_2).

2.5. Determinazione del contenuto di metalli pesanti

Dopo esser stati conservati a -20°C i campioni di animali venivano disidratati a 40°C in stufa fino al raggiungimento di un peso costante. Alcuni mg di ogni campione sono stati mineralizzati in vaschette di teflon contenenti 3ml di HNO_3 a 120°C per 8 h. Dopo la digestione la soluzione è stata portata ad un volume di 10 ml aggiungendo acqua deionizzata. Durante ogni mineralizzazione sono state eseguite più "prove in bianco" per verificare l'assenza di contaminazione, introducendo nei contenitori di teflon solo i reagenti. Le analisi sono state effettuate tramite spettrometria di assorbimento atomico, con l'utilizzo di differenti apparecchiature in base al metallo oggetto di studio: In particolare, Cd, Cu sono stati determinati attraverso atomizzazione in fornello di grafite e correttore di fondo Zeeman; per il Hg è stato usato il FIMS (Flow Injection Mercury System). Ogni analisi è stata effettuata tre volte e l'accuratezza delle procedure analitiche è stata valutata confrontando i risultati di contemporanee digestioni ed analisi di materiale standard di riferimento (Standard Reference Materials, SRMs): 1566 "oyster tissue" del National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, USA) I risultati della determinazione sono stati accettati solo se i valori misurati per i materiali di riferimento rientravano nell'intervallo di concentrazione certificata; in caso contrario le analisi sono state ripetute. La concentrazione degli elementi (espressa in $\mu\text{g/g}$) è stata calcolata col metodo delle "aggiunte interne". I coefficienti di variazione per i vari elementi erano compresi fra il 5 ed il 10%.

2.6. Analisi statistica

Per ogni esperimento è stato costruito un attogramma al fine di avere una rappresentazione grafica della distribuzione dell'attività locomotoria degli animali. Per evidenziare la presenza di un ritmo di attività circadiano (periodo tra 20 e 26 ore), tutte le serie temporali sono state analizzate mediante il periodogramma di Sokolove e Bushnell (1978), utilizzando il programma Wintau 4.0 scritto da R. Refinetti. Il periodogramma veniva costruito

calcolando i valori Q_p per ogni periodo nel range 20-26 ore. Il Q_p è un indice del valore della periodicità dell'attività, la presenza di un periodo statisticamente significativo nel set di dati è associato ad un elevato valore di Q_p (Refinetti, 2004). Oltre all'analisi periodale, il dato grezzo dell'attività locomotoria così come rilevato dallo strumento (bound per minuto) è stato utilizzato per calcolare la quantità di attività locomotoria totale (registrata a partire dal secondo giorno fino al termine dell'esperimento) e la distribuzione dell'attività locomotoria nelle ore di luce e in quelle di buio. Per l'analisi statistica della ripartizione dell'attività fra ore di buio e quelle di luce è stato utilizzato il Sign-test (Siegel e Castellan, 1989). Il confronto tra il tasso di mortalità dei talitri di controllo e gli animali esposti al metallo è stato solo qualitativo non potendo effettuare nessuna analisi statistica a causa del basso numero di animali saggiati. Negli esperimenti riguardanti la scelta binaria, per verificare se la frequenza degli animali che sceglievano la metà non contaminata o quella con il metallo differiva dall'uniformità, è stato impiegato il G-test.

3. RISULTATI

3.1. Ritmi di attività

I talitri esposti a 0,37 ppm di Hg hanno mostrato la stessa periodicità dei controlli (24,0 h, $Q_p = 301$, $df = 143$, $p < 0,0037$ per gli animali esposti al metallo; 24,0 h, $Q_p = 528$, $df = 143$, $p < 0,0037$ nel controllo); tuttavia è presente una maggiore quantità di attività locomotoria (18922 bounds rispetto al controllo 14572 bounds) (Fig. 3 A, B).

L'analisi della ripartizione dell'attività fra ore di luce e ore di buio indica (Fig. 4), ad eccezione del primo giorno di registrazione, un'attività tendenzialmente più concentrata nelle ore notturne per gli animali di controllo ($N = 7$, $x = 1$, $p = 0,062$, Sign-test), al contrario, gli animali esposti al Hg mostravano una maggiore attività nelle ore di luce ($N = 7$, $x = 0$, $p < 0,008$, Sign-test) (Fig. 4). Il tasso di sopravvivenza degli animali di controllo registrato alla fine primo, quinto e settimo giorno è alto sia nei controlli (100%, 100%, 87,5%) che negli sperimentali (100%, 76,4%, 58,8%).

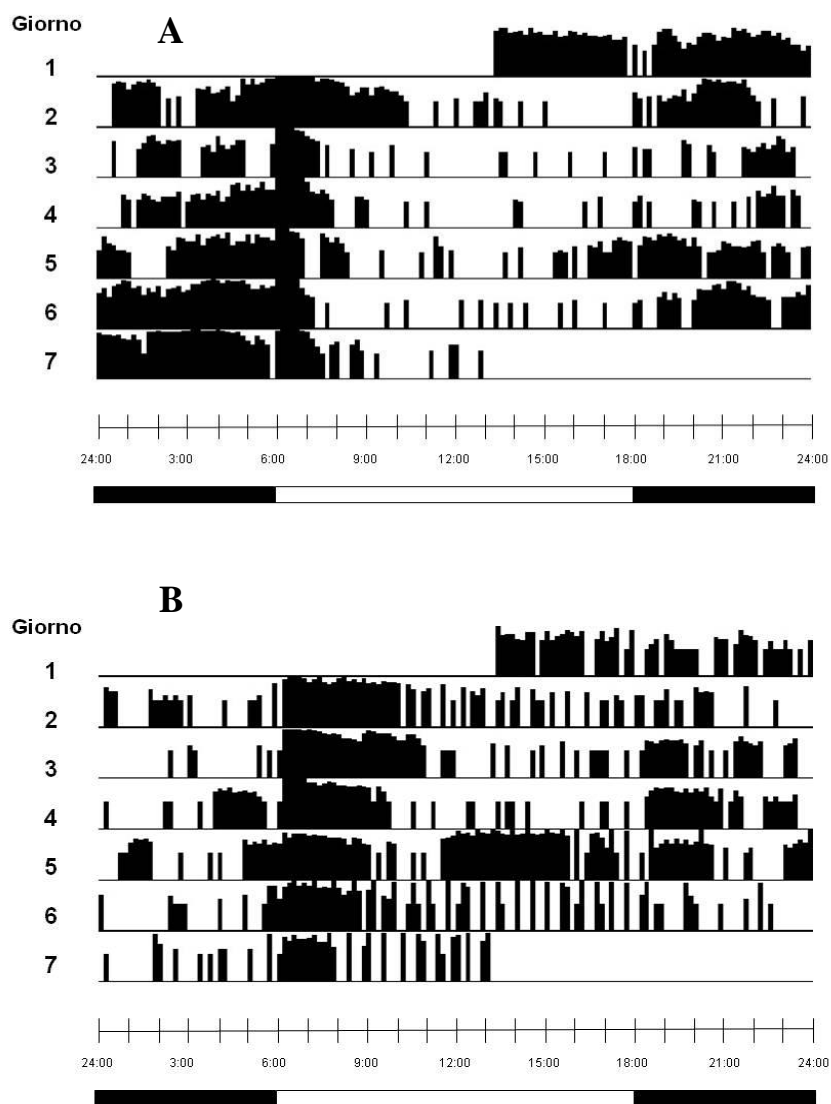


Fig. 3. Attogrammi dell'attività degli animali di controllo (A), ed esposti a 0,37 ppm di Hg (B). Ogni linea orizzontale corrisponde a un giorno di registrazione, le bande verticali rappresentano l'attività dei talitri, la linea tratteggiata indica le ore, la barra sotto il grafico rappresenta le ore di buio (nera) e le ore di luce (bianca). Per ulteriori informazioni si veda sezione 2.6

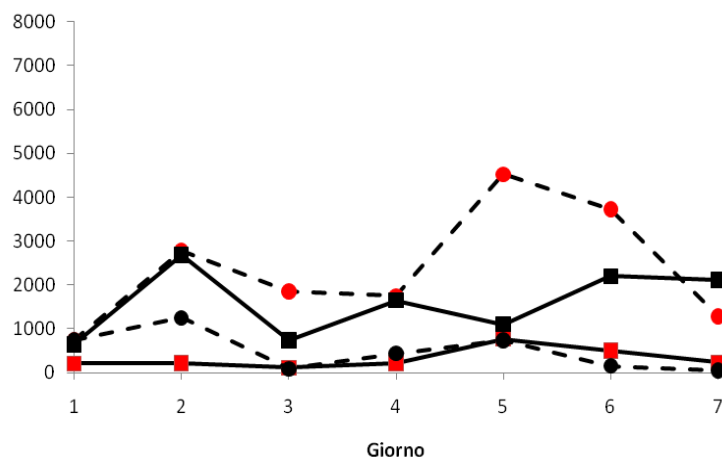


Fig. 4. Attività locomotoria giornaliera registrata nelle ore di luce (rappresentati dal cerchio e dalla linea tratteggiata) e di buio (rappresentati dal quadrato e dalla linea continua) nei talitri di controllo (simboli neri) ed esposti a 0,37 ppm di Hg (simboli grigi). Sull'asse orizzontale sono indicati i giorni.

Gli anfipodi esposti a 0,66 ppm di Hg hanno mostrato un'attività locomotoria complessiva di 5358 bounds e con una periodicità di 23.8 h ($Q_p = 333$, $df = 141,8$, $p < 0,0037$) (Fig. 5). Al contrario l'attività totale del controllo era molto maggiore (40515 bounds) rispetto agli animali esposti a 0,66 ppm di Hg con periodicità di 24,0 h ($Q_p = 392$, $df = 143$, $p < 0,0037$) (Fig. 5). I dati sull'attività giornaliera degli animali di controllo hanno evidenziato una maggiore attività nelle ore notturne ($N = 7$, $x = 0$, $p = 0,008$ Sign-test), al contrario, gli animali esposti a 0,66 ppm non hanno mostrato una differenza significativa tra l'attività nelle ore di luce e quelle di buio ($N = 7$, $x = 2$, $p = N.S.$ Sign-test) (Fig. 6). Inoltre, il trend del tasso di sopravvivenza degli anfipodi esposti al contaminante alla fine del primo, quinto e settimo giorno (93,3, 67%, 60%) non differisce dal controllo (100%, 80%, 53%).

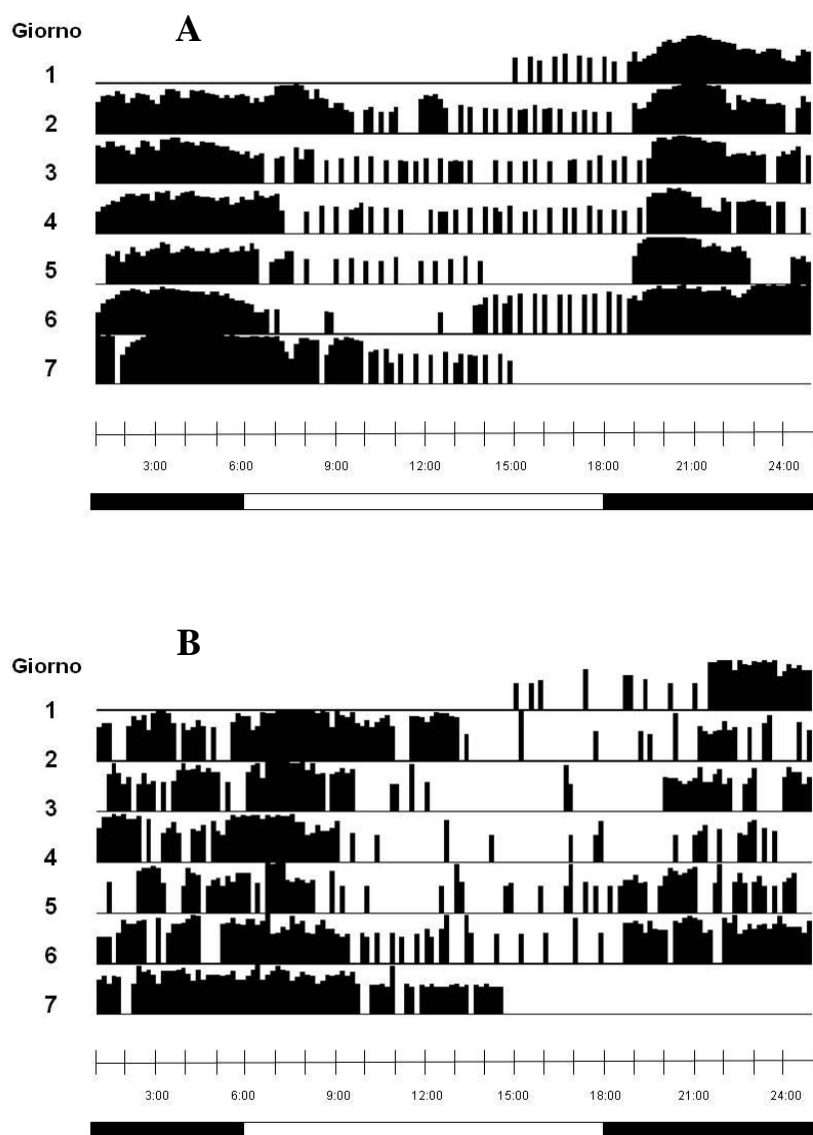


Fig. 5. Attogrammi dell'attività degli animali di controllo (A), ed esposti a 0,66 ppm di Hg (B). Per ulteriori dettagli si veda Fig.3

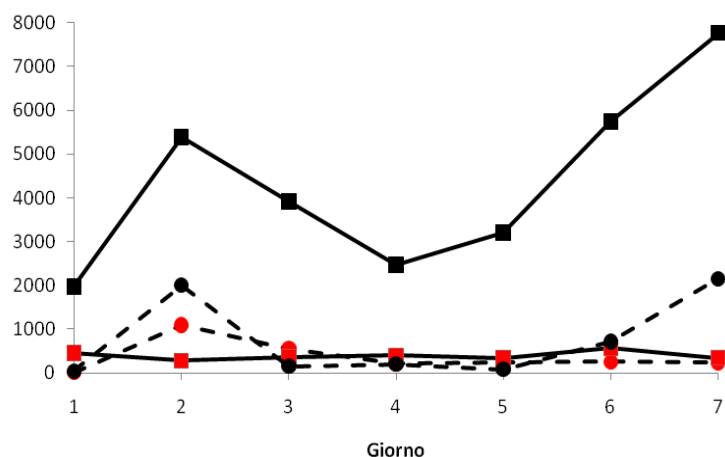
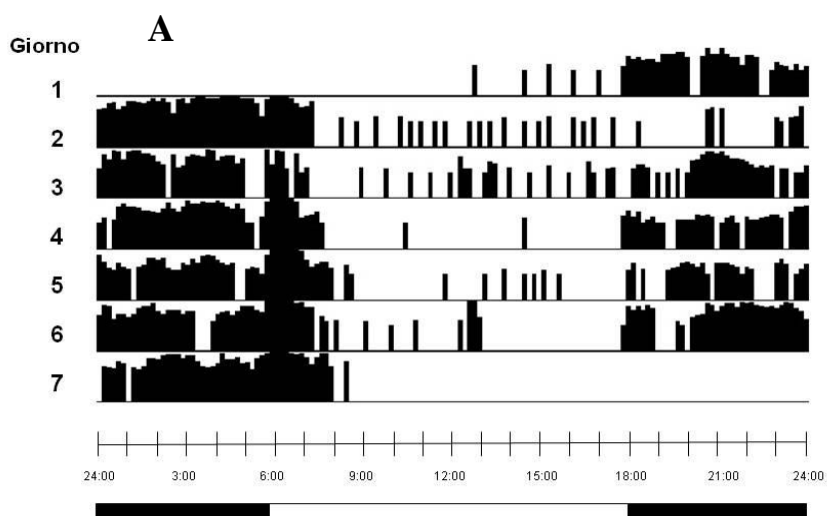


Fig. 6. Attività locomotoria giornaliera registrata nelle ore di luce e di buio nei talitri di controllo (simboli neri) ed esposti a 0,66 ppm di Hg (simboli grigi). Per ulteriori informazioni si veda la fig. 4.

Gli animali saggiati in presenza di 10 ppm di Cu hanno mostrato un incremento dell'attività (25631 bounds) rispetto al controllo (15266 bounds) con periodicità di 24,0 h ($Q_p = 500$, $df = 143$, $p < 0,0037$) (Fig. 7 A, B). Al contrario, i talitri esposti a 20 ppm hanno mostrato una notevole riduzione dell'attività locomotoria totale (506 bounds), seppur mantenendo una periodicità pari a 24 h ($Q_p = 266$, $df = 143$, $p < 0,0037$) (Fig. 7 C).



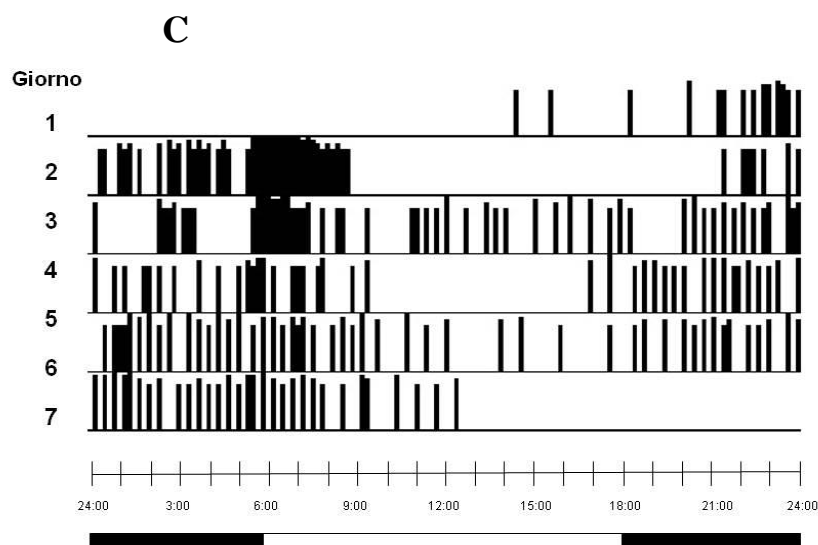
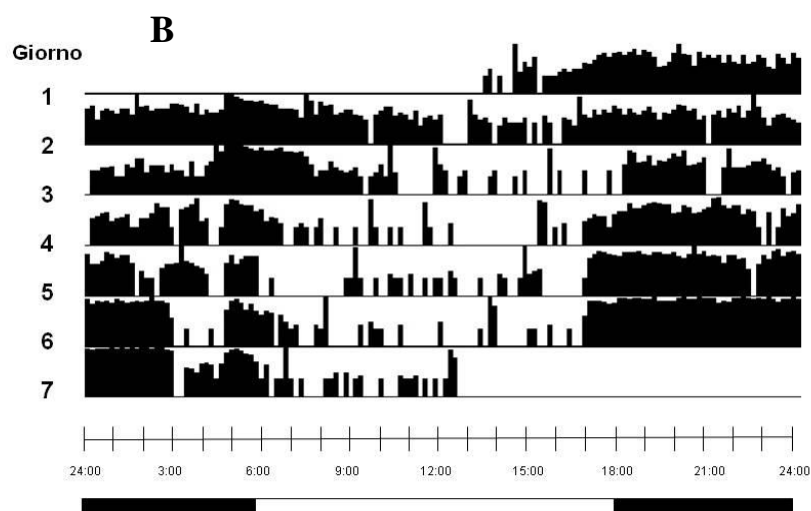


Fig. 7. Attogrammi dell'attività degli animali di controllo (A), ed esposti a 10 ppm (B) e 20 ppm di Cu (C). Per ulteriori dettagli si veda Fig.3

I talitri di controllo ed esposti a 10 ppm hanno mostrato una maggiore attività nelle ore notturne ($N = 7$, $x = 0$, $p = 0,008$ Sign-test) (Fig. 8), contrariamente a quanto osservato per gli animali esposti a 20 ppm di Cu ($N = 7$, $x = 2$, $p = \text{N.S.}$ Sign-test) (Fig. 9). Il tasso di sopravvivenza dei talitri di controllo e dello sperimentale a 10 ppm mostrava valori simili (100%, 88%, 88%, nel controllo e 93,3%, 86,6%, 73% nello sperimentale), viceversa una mortalità molto più alta è stata registrata nello sperimentale a 20 ppm (93,3%, 34% e del 20%). È inoltre opportuno sottolineare che, nel corso delle verifiche sulla mortalità effettuate al quinto e settimo giorno, gli animali vivi esposti a 20 ppm di Cu mostravano una ridotta capacità di movimento.

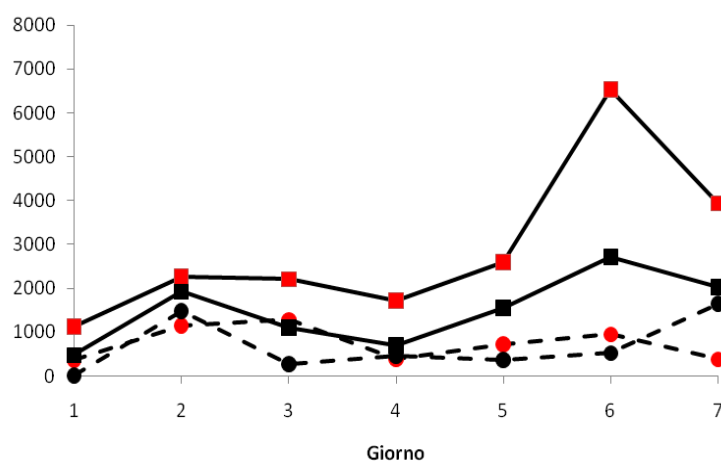


Fig. 8. Attività locomotoria giornaliera registrata nelle ore di luce e di buio nei talitri di controllo (simboli neri) ed esposti a 10 ppm di Cu (simboli grigi). Per ulteriori informazioni si veda la fig. 4.

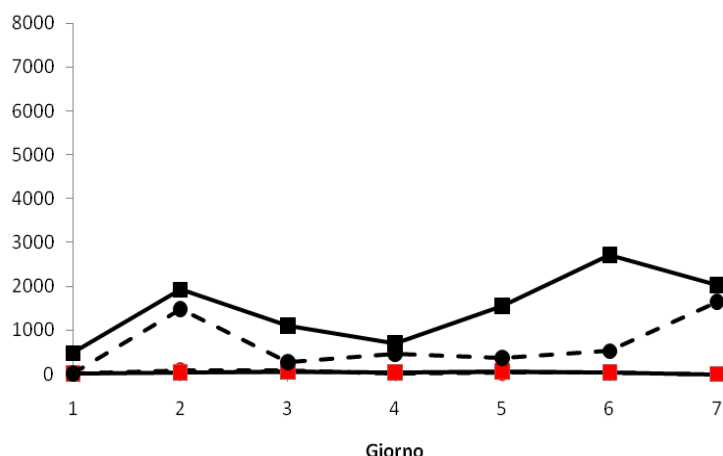


Fig. 9. Attività locomotoria giornaliera registrata nelle ore di luce e di buio nei talitri di controllo (simboli neri) ed esposti a 20 ppm di Cu (simboli grigi). Per ulteriori informazioni si veda la fig. 4.

I talitri esposti alla concentrazione di 0,5 ppm di Cd mostravano l'assenza di periodicità ($Q_p = 184$, $df = 144,2$, $p = N.S.$) contrariamente a quanto osservato per i controlli, caratterizzati da ritmo periodale di 24,0 h ($Q_p = 363$, $df = 143$, $p < 0,0037$) (Fig. 10). Inoltre, è opportuno sottolineare la maggiore quantità di attività totale registrata nello sperimentale (38897 bounds) rispetto al controllo (26619 bounds). I dati ottenuti nel controllo (Fig. 11) indicano, inoltre, un'attività superiore nelle ore di buio rispetto alle ore di luce ($N = 7$, $x = 0$, $p = 0,008$, Sign-test); tali risultati, fatta eccezione per il secondo giorno di registrazione, sono riscontrabili anche negli animali saggiati in presenza del metallo ($N = 7$, $x = 1$, $p = 0,062$ al limite della significatività Sign-test), (Fig. 11). Il trend del tasso di sopravvivenza dello sperimentale alla fine del primo, quinto e settimo giorno (93,3%, 87%, 73%) non differisce sensibilmente dal controllo (100%, 87%, 67%).

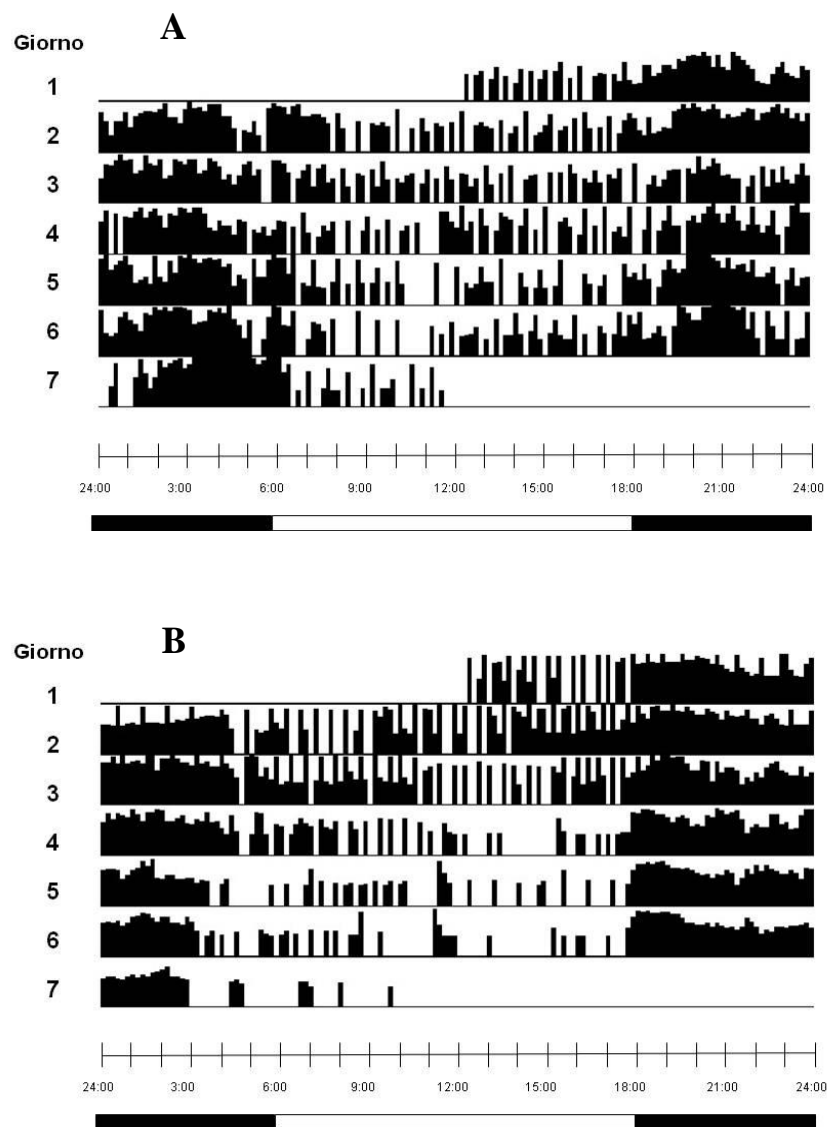


Fig. 10. Attogrammi dell'attività degli animali di controllo (A), ed esposti a 0,5 ppm di Cd (B). Per ulteriori dettagli si veda Fig.3

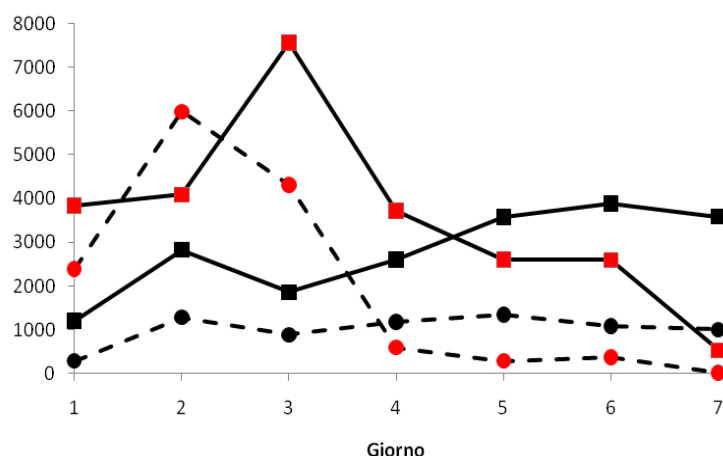


Fig. 11. Attività locomotoria giornaliera registrata nelle ore di luce e di buio nei talitri di controllo (simboli neri) ed esposti a 0,5 ppm di Cu (simboli grigi). Per ulteriori informazioni si veda la fig. 4.

Come precedentemente osservato nel test a concentrazione minore, anche i talitri esposti ad 1 ppm di Cd hanno evidenziato una maggiore quantità di attività (27919 bounds) rispetto al controllo (10942 bounds). Inoltre, gli animali esposti al metallo non mostrano la presenza di ritmo di attività circadiano ($Q_p = 162$, $df = 143$, $p = N.S.$) diversamente da quanto osservato per i talitri di controllo (periodicità di 23,8 h, $Q_p = 261$, $df = 141,8$, $p < 0,0037$) (Fig. 12).

Inoltre, nel controllo, così come nello sperimentale escluso il secondo giorno, l'attività registrata è concentrata maggiormente nelle ore di buio ($N = 7$, $x = 0$, $p = 0,008$, per il controllo; $N = 7$, $x = 1$, $p = 0,062$, nello sperimentale Sign-test) (Fig. 13). Il trend della percentuale di sopravvissuti nella vaschetta controllo al termine del primo, quinto e settimo giorno è rispettivamente del 100%, 88%, 75%, una mortalità maggiore è stata registrata nello sperimentale dove il tasso di sopravvivenza negli stessi giorni è 93,3%, 80%, 53%.

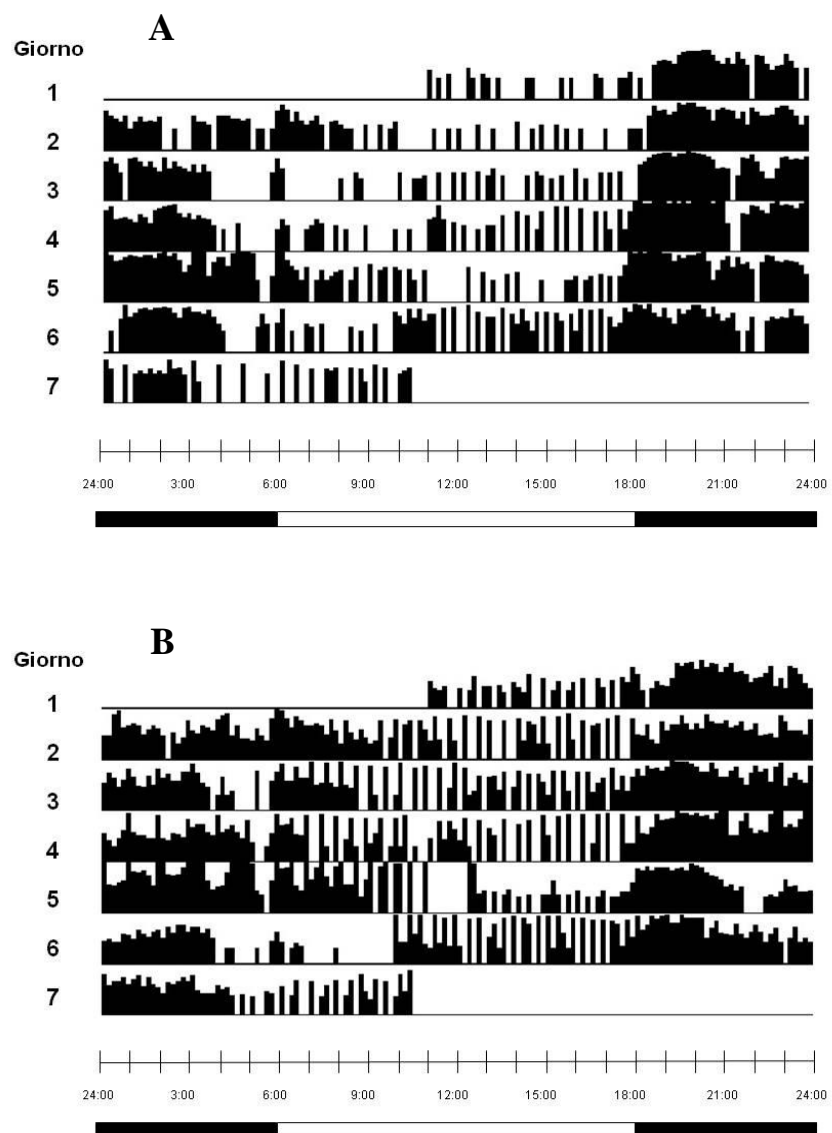


Fig. 12. Attogrammi dell'attività degli animali di controllo (A), ed esposti a 1 ppm di Cd (B). Per ulteriori dettagli si veda Fig.3

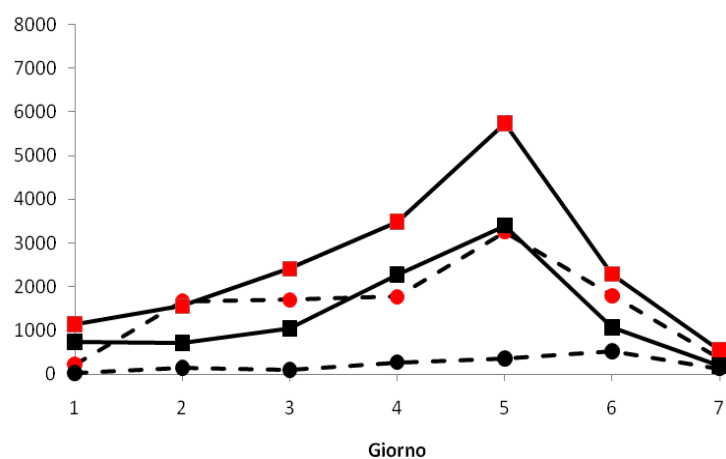


Fig. 13. Attività locomotoria giornaliera registrata nelle ore di luce e di buio nei talitri di controllo (simboli neri) ed esposti a 1 ppm di Cu (simboli grigi). Per ulteriori informazioni si veda la fig. 4.

3.2.Bioaccumulo

I risultati dell'analisi del contenuto di Hg, Cu e Cd mostrano che la concentrazione dei tre metalli rilevata negli animali cresce all'aumentare della concentrazione a cui erano esposti gli animali (Fig. 14).

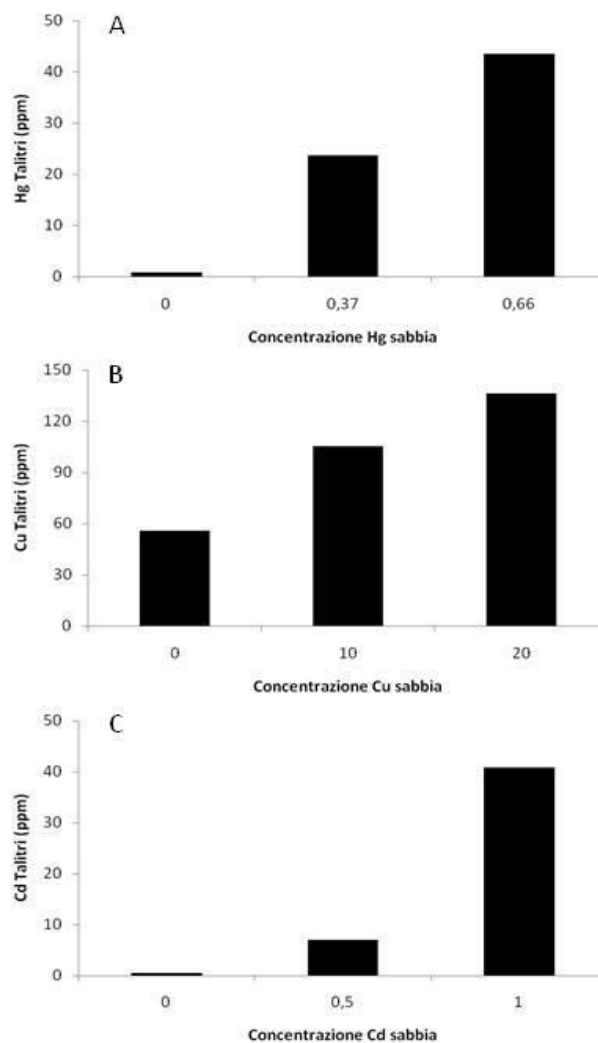


Fig. 14. Concentrazione di Hg (A), Cu (B) e Cd (C) nei talitri (espressa in ppm) alla fine dei sette giorni di durata dei test relativi ai ritmi di attività. Sull'asse delle ascisse è riportata la concentrazione del metallo nel substrato espressa in ppm.

3.3. Scelta binaria

I dati sulla scelta binaria in assenza di inquinante mostrano una distribuzione casuale da parte dei talitri, indipendentemente dall'orientamento delle due metà del cilindro ($G = 1,367$, $df = 1$, $p = \text{N.S.}$ G-test) (Fig. 15 A), ($G = 0,000$, $df = 1$, $p = \text{N.S.}$, G-test) (Fig. 15 B).

Negli l'esperimento con il Hg, i talitri mostrano una netta preferenza per la metà non contaminata ad entrambe le concentrazioni utilizzate (Hg 0,37, $G = 26,114$, $df = 1$, $p < 0,001$; Hg 0,66, $G = 12,490$, $df = 1$, $p < 0,001$ G-test) (Fig.16).

Negli esperimenti effettuati con Cu (Fig.16), mentre alla concentrazione più bassa la percentuale di talitri ritrovata nei due compartimenti della ciotola risulta simile ($G = 0,090$, $df = 1$, $p = \text{N.S.}$ G-test), a 20 ppm la percentuale di animali presenti nella parte non contaminata è nettamente superiore rispetto a quella contaminata ($G = 9,040$, $df = 1$, $p < 0,01$ G-test). I dati riguardanti gli esperimenti con il Cd mostrano una distribuzione dei talitri non condizionata dalla presenza del metallo (Fig. 16). Infatti, la distribuzione degli animali risulta uniforme sia a 0,5 ppm ($G = 1,027$, $df = 1$, $p = \text{N.S.}$ G-test) che a 1 ppm di Cd ($G = 1,415$, $df = 1$, $p = \text{N.S.}$ G-test).

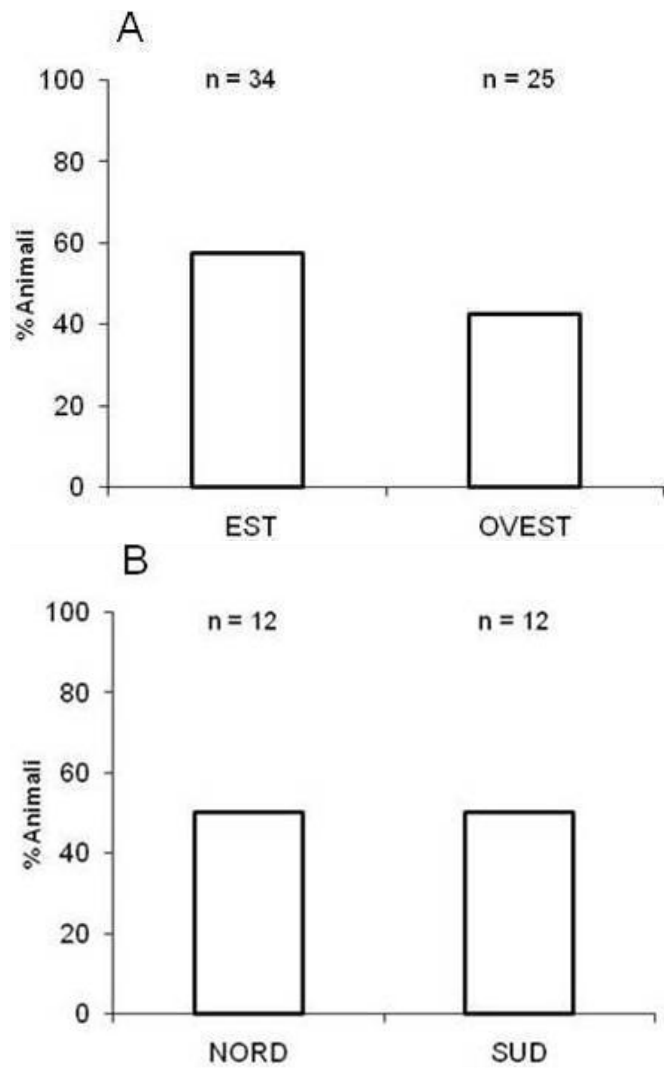


Fig. 15. Dati relativi alle scelte binarie in assenza di contaminante. Sull'asse delle ascisse è indicato l'orientamento dei due compartimenti (A: Est-Ovest, B: Nord-Sud), sull'asse delle ordinate è riportata la percentuale di animali trovati infossati. Nei grafici è indicato, inoltre, il numero totale di animali saggiati (n).

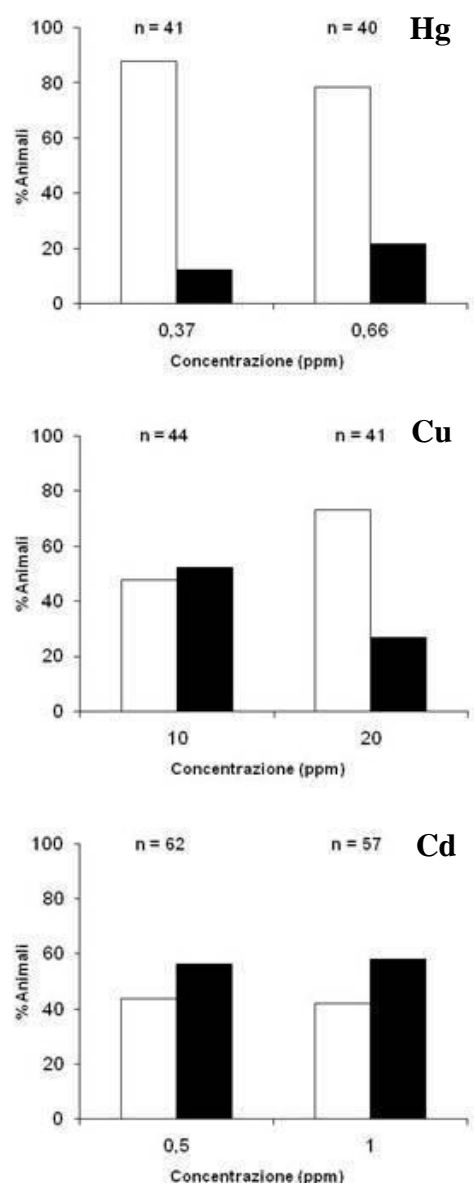


Fig. 16. Dati relativi alle scelte binarie in presenza di Hg, Cu e Cd. Sull'asse delle ascisse è rappresentata la concentrazione del metallo nella metà contaminata. L'asse delle ordinate indica la percentuale di animali trovati infossati nella metà non contaminata (barre bianche) e in quella contaminata (barre nere) (n, il numero totale di animali saggiati).

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dall'analisi del contenuto di Hg, Cu e Cd presenti nei tessuti dei talitri, al termine dei sette giorni di durata degli esperimenti, si può evincere la buona capacità da parte di *T. saltator* di accumulare tutti e tre i metalli dal sedimento. Inoltre, in modo analogo a quanto osservato da Weeks e Rainbow (1991, 1993) riguardo l'accumulo di Cu e Zn dal cibo e dal medium acquoso in *Orchestia mediterranea* e *Orchestia gammarellus*, anche l'assunzione di Hg, Cu e Cd dal sedimento in *T. saltator* all'aumentare della concentrazione di esposizione. Tale relazione risulta evidente per tutti e tre i metalli utilizzati. Inoltre, risulta evidente la differenza tra la quantità di contaminante rilevata negli animali di controllo e quella riscontrata nei talitri esposti alle due concentrazioni di ciascun metallo. L'alta concentrazione di Cu rilevata negli animali di controllo (56 ppm) rispetto ad Hg e Cd è ascrivibile all'importante ruolo biologico svolto da questo metallo nei talitri (presente in alcuni enzimi e pigmenti respiratori (emocianina) (Depledge e Rainbow, 1990; Marsden e Rainbow, 2004). È opportuno ricordare, inoltre, che le concentrazioni dei metalli utilizzate nei test effettuati sono riscontrabili in natura in molte località della costa toscana in cui è stata rilevata la presenza di *T. saltator*. (vedi Ugolini et al., 2004).

Analizzando le risposte comportamentali di scelta binaria messe in atto dai talitri esposti al Hg per 24 ore, si può affermare che gli animali, per entrambe le concentrazioni saggiate rilevano la presenza del metallo, come dimostra l'alta percentuale di talitri che sceglievano la metà non contaminata. Tali risultati concordano con i dati ottenuti da Erdem e Maedows (1980) riguardo la scelta di substrato da parte di *C. volutator* in presenza di concentrazioni crescenti di Hg.

Per quanto riguarda i dati sulla scelta binaria in presenza di Cu, contrariamente ai risultati ottenuti nei test con Hg, gli anfipodi dopo un'esposizione di 24 ore a 10 ppm non hanno mostrato alcuna preferenza di substrato, come testimonia la distribuzione casuale degli animali nei due sedimenti. Viceversa, nel test a 20 ppm gli animali hanno mostrato una netta preferenza verso la parte di substrato non contaminata, in accordo con quanto osservato per lo stesso metallo da Bat e Raffaelli (1998) nell'anfipode *C. volutator*.

Gli animali esposti al Cd per 24 h non sembrano avvertire la presenza del metallo indipendentemente dalla concentrazione di esposizione. Infatti, la distribuzione dei talitri nelle due metà della ciotola era casuale sia nel test a 0.5 ppm che a 1 ppm. Tuttavia, una prolungata esposizione al Cd, sia alla concentrazione più alta sia a quella minore, sembra influenzare maggiormente il comportamento dei talitri (si veda risultati sul ritmo attività del Cd alle due concentrazioni).

Analizzando i dati ottenuti nei test sul ritmo d'attività, al di là dei differenti risultati ottenuti nei controlli probabilmente dovuti alle differenze

stagionali in cui sono stati saggati gli animali (Nardi et al., 2003), si può osservare che in presenza di 0,37 ppm Hg l'attività totale è maggiore rispetto agli animali di controllo. Questo risultato probabilmente indica, in accordo con i dati delle scelte binarie che evidenziano la capacità dei talitri di rilevare la presenza del metallo, un tentativo di fuga da una condizione ambientale sfavorevole (Kirkpatrick et al., 2006). Inoltre, va sottolineato come l'attività dei talitri esposti a 0,37 ppm si sia concentrata maggiormente nelle ore di luce, a differenza degli animali di controllo. Queste variazioni comportamentali messe in atto da *T. saltator* in risposta alla presenza di Hg potrebbero rilevarsi particolarmente dannose (aumentando il rischio di predazione e di disidratazione) in popolazioni esposte in natura a tali concentrazioni del metallo.

Nel test effettuato con 0.66 ppm di Hg è stata registrata un'attività dei talitri quasi del 90% più bassa rispetto agli animali di controllo, rivelando un'elevata tossicità del metallo a tali concentrazioni con probabili influenze negative sul metabolismo e di conseguenza sulla capacità motoria degli animali.

In modo analogo a quanto osservato in presenza di Hg a concentrazione minore, anche negli esperimenti sul ritmo di attività a 10 ppm di Cu i talitri hanno mostrato una quantità di attività locomotoria maggiore. Al contrario, confermando i risultati ottenuti da Mills et al. (2006) riguardo a una diminuzione dell'attività in *G. pulex* esposto a concentrazioni crescenti di Cu, i talitri saggati per sette giorni a 20 ppm hanno mostrato una minore attività rispetto agli animali di controllo. Tali risultati sono probabilmente dovuti all'elevata tossicità del Cu a tali concentrazioni, con evidenti effetti sulla capacità motoria dei talitri ed inoltre sulla mortalità degli animali (quasi 80% alla fine del test).

La quantità di attività totale registrata (alla fine dei sette giorni di esposizione) negli animali saggati in presenza di Cd è risultata, per entrambe le concentrazioni, maggiore rispetto agli animali di controllo. In analogia con i risultati osservati alle concentrazioni più basse di Hg e Cu, tali risultati potrebbero essere interpretati come una reazione da parte dei talitri di sfuggire ad una condizione ambientale particolarmente sfavorevole rappresentata dalla presenza del metallo (Kirkpatrick et al., 2006). È opportuno sottolineare come, a differenza del comportamento abituale di *T. saltator* (Bregazzi e Naylor, 1972; Williams, 1980a; Ugolini, 2003), gli animali esposti alle due concentrazioni del metallo non abbiano mostrato una significativa presenza di un ritmo circadiano. L'aumento di attività locomotoria mostrato dai talitri esposti a 0,5 e 1 ppm di Cd è in contrasto con quanto noto in letteratura riguardante l'effetto del Cd sul nuoto in altre specie di anfipodi (*Gammarus lawrentianus*) (Wallace e Estephan, 2004) e misidiacei (*Neomys integer*) (Roast et al., 2000). Questo, probabilmente, è dovuto al diverso grado di tolleranza mostrato dai talitri, rispetto ad altri crostacei, nei confronti di elevate concentrazioni di Cd. Infatti, confrontando i dati dell'LC₅₀ in *G. lawrentianus* (0,25mg L⁻¹ Cd) (Wallace e Estephan, 2004) e in misidiacei (2,58 µg L⁻¹ Cd) (Roast et al., 2000), è facile

notare le differenze rispetto a *T. saltator* (27,66 mg L⁻¹ Cd) (Ungherese e Ugolini, 2009).

In conclusione, *T. saltator* sembra avere una buona capacità di accumulare tutti e tre i metalli dal sedimento in relazione alla concentrazione di esposizione e tale risultato costituisce la prima prova diretta dell'importanza della sabbia come fonte di metalli assimilabili nei talitri. Inoltre, l'utilizzo del radar a microonde consente di rilevare differenze tra animali di controllo e animali saggiati in condizioni sperimentali e tali variazioni comportamentali potrebbero essere utilizzate come biomarker da esposizione a metalli in traccia. Le risposte messe in atto dagli anfipodi in presenza di questi elementi ne evidenziano l'elevata tossicità e la forte pericolosità a livello ecologico sia perché facilmente accumulabili, sia per le conseguenze sul comportamento. Infatti Hg, Cu e Cd hanno dimostrato, seppur in modo differente l'uno dall'altro, di poter influire notevolmente sull'attività locomotoria dei talitri esponendo, teoricamente, la specie ad un più alto rischio di predazione generando, probabilmente, conseguenze negative sulla fitness individuale.

5. BIBLIOGRAFIA

- Amiard, J.C., Amiard – Triquet, C., Berthet, B. & Metayer, C.** 1987. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **106**, 73-89.
- Bat L. & Raffaelli, D.** 1998. Sediment toxicity testing: a bioassay approach using the amphipod *Corophium volutator* and the polychaete *Arenicola marina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **226**, 217-239
- Bregazzi, P.K.** 1972. The effect of low temperature upon locomotor activity rhythm of *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda). *Journal of Experimental Biology*, **57**, 393-399.
- Bregazzi P. K. & Naylor, E.** 1972. The locomotor activity rhythm of *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda). *Journal of Experimental Biology*, **57**, 375-391.
- De Lange, Noordoven, W., Murk, A.J., Lurling, M. & Peeters, E.T.** 2006. Behavioral response of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, **78**, 209-216.
- Depledge M.H & Rainbow, P.S.** 1990. Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. Mini-Review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **97**, 1-7.
- Ercolini, A.** 1960. Sul ciclo normale di attività di alcuni talitridi litorali. *Bollettino dell'Istituto e museo di zoologia della Università di Torino*, **6**, 163-170

- Erdem C. & Maedows, P.S.** 1980. The Influence of mercury on the burrowing behaviour of *Corophium volutator*. *Marine Biology*, **56**, 233-237.
- Geppetti L. & Tongiorgi P.** 1967. Nocturnal migration of *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda). *Monitore Zoologico Italiano (N.S.)*, **1**, 37-40.
- Hellou, J., Cheeseman, K., Jouvenelle, M.-L. & Robertson, S.** 2005. Behavioral response of *Corophium volutator* relative to experimental conditions, physical and chemical disturbances. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 3061-3068.
- Herrnkind, W.F.** 1983. Movement patterns and orientation. In: *The biology of Crustacea. Behaviour and Ecology*. (Ed. by F.J., Vernberg & W., Vernberg) Academic Press, New York.
- Kirkpatrick, A.J., Gerhardt, A., Dick, J.T.A., McKenna, M. & Berges, J.A.** 2006. Use of multispecies freshwater biomonitors to assess behavioural changes of *Corophium volutator* (Pallas, 1766) (Crustacea, Amphipoda) in response to toxicant exposure in sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **64**, 298-303.
- Lawrence, A.J. & Poulter, C.** 1996. The potential role of the estuarine amphipod *Gammarus duebeni* in sub-lethal ecotoxicity testing. *Water Science and Technology*, **34**, 93-100.
- Mardsen, I.D. & Rainbow, P.S.** 2004. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology - the amphipod example? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **300**, 373-408.
- Mills, C.L., Shukla, D.H. & Compton, G.J.** 2006. Development of a new low cost high sensitivity system for behavioural ecotoxicity testing. *Aquatic Toxicology*, **77**, 197-201.
- Nardi M., Morgan, E. & Scapini F.** 2003. Seasonal variation in the free-running period in two *Talitrus saltator* populations from Italian beaches differing in morphodynamics and human disturbance. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **58s**, 199-206.
- Naylor, E.** 1988. Clock – controlled behaviour in intertidal animals. In: Behavioural adaptations to intertidal life. In: *Behavioral Adaptations to Intertidal Life* (Ed. by G. Chelazzi & M. Vannini) NATO ASI Ser. A **151**. Plenum Press New York.
- Palmer, J.D.** 1995. *The biological rhythms and clocks intertidal animals*. Oxford University Press, New York.
- Pardi L. & Grassi, M.** 1955 Experimental modification of direction finding in *Talitrus saltator* Montagu and *Talorchestia deshayesei* (Aud.) (Crustacea-Amphipoda). *Experientia*, **11 (5)**, 202-205.
- Pasquali V. & Renzi, P.** 2005. On the use of microwave radar devices in chronobiology studies: an application with *Periplaneta americana*. *Behavioural Research Methods*, **37**, 522-527.
- Pasquali, V.** 2006. *Ritmi ultradiani: un approccio comparato*. Tesi di dottorato, Università di Roma “La Sapienza”.

- Perez, M. H. & Wallace, W.G.** 2004. Differences in prey capture in grass shrimp *Palaemonetes pugio* collected along an environmental impacted gradient. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **46**, 81-89.
- Refinetti, R.** 2004 Non-stationary time series and the robustness of circadian rhythms. *Journal of Theoretical Biology*, **227**, 571-581.
- Roast, S.D., Widdows, J. & Jones, M.B.** 2000. Mysids and trace metals: disruption of swimming as a behavioural indicator of environmental contamination. *Marine Environmental Research*, **50**, 107-112.
- Roast, S.D., Widdows, J. & Jones, M.B.** 2001. Impairment of mysid (*Neomysis integer*) swimming ability: an environmentally realistic assessment of the impact of cadmium exposure. *Aquatic Toxicology*, **52**, 217-227.
- Rüppel, G.** 1967. Tagesrhythmsche und langfristige Faunenverschiebungen in marinen supralitoral. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, **60**, 338-375.
- Scapini F., Chelazzi I., Colombini I. & Fallaci M.** 1992. Surface activity, zonation and migration of *Talitrus saltator* on a Mediterranean Beach. *Marine Biology*, **112**, 573-581.
- Scapini F., Audoglio, M., Chelazzi I., Colombini I. & Fallaci, M.** 1997. Astronomical, landscape, and climatic factors influencing oriented movements of *Talitrus saltator* in nature. *Marine Biology*, **128**, 63-72.
- Siegel, S. & Castellan, J.J.N.** 1989. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*, 2nd edition, McGraw Hill, New York.
- Sokolove, P.G. & Bushell, W.N.** 1978. The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *Journal of Theoretical Biology*, **72**, 131-160.
- Ugolini, A.** 2003. Activity rhythms and orientation in sandhopper (Crustacea, Amphipoda). *Frontiers in Biosciences*, **8**, 722-732.
- Ugolini, A., Borghini, F., Calosi, P., Bazzicalupo, M., Chelazzi, G. & Focardi, S.** 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 526-532.
- Ugolini, A., Somigli, S. & Mercatelli, L.** 2006. Green land and blue sea: a coloured landscape in the orientation of the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Amphipoda, Talitridae). *Journal of Experimental Biology*, **209**, 2509-2514.
- Ugolini, A., Ungherese, G., Somigli, S., Galanti, G., Baroni, D., Borghini, F., Cipriani, N., Nebbiai, M., Passaponti, M. & Focardi, S.** 2008. The amphipod *Talitrus saltator* as a bioindicator of human trampling on sandy beaches. *Marine Environmental Research*, **65**, 349-357.
- Ungherese, G. & Ugolini, A.** 2009. Sandhopper solar orientation as a behavioral biomarker of trace metals contamination. *Environmental Pollution*, **157**, 1360-1364.

- Wallace, W.G. & Estephan, A.** 2004. Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a gammaridean amphipod (*Gammarus lawrencianus*). *Aquatic Toxicology*, **69**, 289–297
- Weeks, J.M. & Rainbow, P.S.** 1991. The uptake and accumulation of zinc and copper from solution by two species of talitrid amphipods (Crustacea). *Journal of Marine Biology Association of UK*, **45**, 811-826.
- Weeks, J.M. & Rainbow, P.S.** 1993. The relative importance of food and seawater as sources of copper and zinc to talitrid amphipods (Crustacea; Amphipoda; Talitridae). *Journal of Applied Ecology*, **30**, 722-735
- Wildish, D.J.** 1988. Ecology and natural history of aquatic Talitroidea. *Canadian Journal of Zoology*, **66**, 2340-2359.
- Williams, J.A.** 1980a. Environmental influence on the locomotor activity rhythm of *Talitrus saltator* (Crustacea; Amphipoda). *Marine Biology*, **57**, 7-16.
- Williams, J.A.** 1980b. The effect of dusk and dawn on the locomotor activity rhythm of *Talitrus saltator* (Crustacea; Amphipoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **42**, 285-297.
- Williams, J.A.** 1980c. The light response rhythm and seasonal entrainment of the endogenous locomotor rhythm of *Talitrus saltator* (Crustacea; Amphipoda). *Journal of Marine Biology Association of UK*, **60**, 773-785.
- Williams, J.A.** 1995. Burrow - zone distribution of the supralittoral amphipod *Talitrus saltator* on Derbyhaven Beach, Isle of Man: a possible mechanism for regulating desiccation stress? *Journal of Crustacean Biology*, **15**, 466-475.

CAPITOLO 8

Seawater Ca^{2+} concentration influences solar orientation in *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda)

I dati presentati in questo capitolo sono stati oggetto di pubblicazione: A. Ugolini, G. Ungherese, L. Mercatelli, D. Saer, L., Lepri, 2009, “**Seawater Ca^{2+} concentration influences solar orientation in *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda)**” *Journal of Experimental Biology*, Vol. 212, 797-801.

ABSTRACT

The role of salinity in the ecophysiology of many intertidal invertebrates has been extensively investigated. Calcium (Ca^{2+}), magnesium (Mg^{2+}), potassium (K^+) and sodium (Na^+) are the major constituents of seawater and it has been demonstrated that sandhoppers tested under the sun in diluted seawater (3.5‰) head seaward, instead of going landward as expected. Therefore, the variation in seawater salinity (from 35‰ to 3.5‰) influences their directional choice. This paper investigates the contribution of different cations to the sea-land directional choice of *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) by the sun compass orientation mechanism. Results of releases carried out in basic seawater selectively deprived of Ca^{2+} , Mg^{2+} or K^+ and containing the same concentration of Na^+ indicate that only the reduction in Ca^{2+} concentration affects the capacity of solar orientation. The pH does not influence the directional choice of sandhoppers and nor do small variations in salinity in the range 32–39‰. Moreover, the clear photopositive tendency registered in experiments of phototaxis in Ca^{2+} -deprived seawater indicates that the absence of Ca^{2+} does not affect the normal functioning of the visual cells. Therefore, our results show that Ca^{2+} seawater concentration is important for the correct functioning of one of the principal mechanisms of orientation in supralittoral amphipods and it could affect their survival in the field.

Keywords: Calcium, sandhopper, *Talitrus saltator*, orientation, sun compass.

1. INTRODUCTION

The fundamental role played by calcium (Ca^{2+}), alongside the role of other essential elements such as magnesium (Mg^{2+}), potassium (K^+) and sodium (Na^+), is well known in many organisms (Wilkins and Wilkins, 2003). All these elements are also major constituents in terms of cations in seawater, and the role of salinity in the ecology and ecophysiology of many littoral and intertidal invertebrates has been extensively investigated (Kinne, 1963a; Kinne, 1963b; Calosi et al., 2007). Salt (or NaCl) concentration also influences the behavioural traits of many invertebrates, mainly of those species that must maintain or return to some zones in which they live. For example, to maintain their ecological optimum in the water column, estuarine crustacean larvae modify their behavioural response if exposed to salinity changes (Harges and Forward, 1982; Forward, 1989). Upon exposure to higher salinity, these larvae show a clear positive phototaxis and a negative geotaxis, while the opposite pattern is evoked by a salinity decrease. A change in NaCl concentration is the main environmental cue for detection of salinity variation (Harges and Forward, 1982; Forward, 1989). It is also known that many species of sandhoppers are able to return to their ecologically relevant zone (the damp belt of sand near the seawater) following the shortest route possible, therefore theoretically coincident with the sea–land axis of their home beach (Pardi and Papi, 1952; Pardi and Ercolini, 1986). Sandhoppers use the sun and other astronomical and celestial factors to determine the correct direction of orientation. Of course, the directional choice also depends on motivational status: if the sandhopper is in the sea, it orients landward; if in dry conditions, it orients towards the sea (i.e. towards the damp belt of sand) (Papi and Pardi, 1953; Pardi and Papi, 1953). It has also been demonstrated that when sandhoppers are released in deionized or diluted seawater (at a salinity of 3.5‰) they head seaward instead of going landward (Terracini-De Benedetti, 1963; Scapini, 1979). Therefore, the salt concentration of water influences the directional choice; however, the contribution of the different ions to the directional choice has never been investigated.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Animal collection and experimental procedures*

We used adults of *Talitrus saltator* (Montagu) collected on a sandy beach near the Morto Vecchio river mouth (Regional Natural Park of Migliarino San Rossore Massaciuccoli, Pisa, Italy). In the laboratory they were raised in conditions of natural temperature and with a light:dark (L:D) cycle in phase with natural conditions. Food was constantly available and the sand was kept well aired and wet.

The experimental apparatus used in sun compass orientation tests is similar to that used by Pardi and Papi (Pardi and Papi, 1953), slightly modified

by Ugolini and Macchi (Ugolini and Macchi, 1988). It consisted of a goniometer over a circular transparent Plexiglas plate (diameter 30 cm). A transparent Plexiglas bowl (height 5 cm, diameter 20 cm) was placed on the goniometer, and animals were released inside the bowl to be tested. The bowl was covered with a sheet of transparent acetate to prevent animals from escaping. A cylindrical opaline white Plexiglas screen (height 5cm, diameter 30 cm) was placed around the bowl to block out the view of the surrounding landscape but allow individuals to see the sun and the sky.

The experiments were conducted, around midday, in Florence from May to September 2007 and 2008. Sandhoppers were released in groups of about 10 individuals at a time, under the sun and blue sky. Since the sandhoppers were released directly into the water, the expected direction of orientation was 84° (expected landward direction of the sea-land axis of their home beach). One direction for each individual was recorded, after 5–7 min of permanence in the solution, by a freeze-frame image using a video camera placed under the bowl.

A different apparatus was also employed to evaluate the possible influence of Ca^{2+} on simple phototactic behaviour, since it has already been demonstrated that this element affects visual capacity in invertebrates (Dorloechter and Stieve, 1997) and Phototactic orientation (Morel-Laurens, 1987; Wilkins and Wilkins, 2003). In summary, this device consists of a Plexiglas tube (length 60cm, diameter 4.5 cm), horizontally placed, half-filled with artificial seawater, distilled water or artificial seawater deprived of Ca^{2+} (see below). One beam of white light (intensity 6.8mW) generated by a Xenon lamp (150W) penetrates into the tube by an extremity (diameter 20.7 mm). Since these experiments were carried out in a dark room, the binary choice was between light and dark. Groups of 10–12 sandhoppers were confined in a vertical cylinder inserted into the middle of the tube and given free choice after 10 min of permanence in the tube. After release, we counted the number of amphipods present at the two ends after only 30 s.

2.2. Test solutions

We used different solutions depending on the type of trial. All the solutions were prepared 24 h before each test. In every test, the control solution was made by dissolving 33 g of artificial sea salt (Instant Ocean®, Aquarium Systems, Mentor, OH, USA) in 1 litre of double-distilled water in order to achieve a salinity of 33‰ and pH8.20. The saline concentration was checked before the experiments with a hand refractometer (Salt refractometer, Sper Scientific106 ATC, Scottsdale, AZ, USA).

In the test with a reduction of Ca^{2+} concentration, we added a small quantity of a solution of 0.1mol l^{-1} Na_2CO_3 to natural and artificial seawater in order to obtain two solutions with a lower concentration of Ca^{2+} : 79.9% and 52.5% of the initial Ca^{2+} concentration (Tab. 1).

Tab. 1. Concentrations of Ca^{2+} (mg/L) and pH values determined in natural and synthetic seawaters.

Solution	pH	[Ca²⁺] (mg/L)	Percentage Variation
Natural Seawater	8.20	443	
Natural seawater modified	8.70	354	-20.1%
Synthetic seawater	8.20	440	
Synthetic seawater modified	8.90	231	-47.5%

Natural and artificial sea water were modified by adding a solution of Na_2CO_3 (0.1 M).

The sandhoppers' orientation was also tested in a solution of seawater (pH 7.87, salinity 39‰) composed of 30 g of NaCl (0.513 mol l^{-1}), 1.078 g of CaCl_2 (9.71 mmol l^{-1}), 10.16 g of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($49.97 \text{ mmol l}^{-1}$), 0.717 g of KCl ($9.617 \text{ mmol l}^{-1}$) and 0.84g NaHCO_3 (10 mmol l^{-1}), which are the same concentrations as the main cations present in natural seawater (referred to as 'basic' seawater from now on) (Atkinson and Bingman, 1998). To evaluate the possible influence of three of these ions, solutions were also prepared without CaCl_2 (pH 7.95, salinity 37‰), without MgCl_2 (pH 7.41, salinity 32‰) and without KCl (pH 7.90, salinity 39‰) but containing NaCl and NaHCO_3 at the same concentrations. Salinity values of basic seawaters are not referred to in terms of NaCl concentration but to the ion chloride in solution and cannot be considered in order to evaluate the effect of salinity on sandhopper behaviour.

In fact, in order to exclude the possible influence of differences in salinity, the orientation of sandhoppers was tested in solutions of artificial seawater at a salinity range of 33–39‰. In the pH test, the solution of artificial seawater (33‰ of salinity) was modified to obtain two solutions with differing pH: pH 6.50 (modified by adding a small quantify of $0.01 \text{ mol l}^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH}$) and pH 9.20 (modified by adding a small quantity of $0.1 \text{ mol l}^{-1} \text{ NaOH}$). All chemicals were purchased from Sigma Aldrich (Milan, Italy).

2.3. *pH measurement and Ca^{2+} ion determination*

The determination of pH in both natural and synthetic seawaters was performed with a pH meter (pH340i; WTW, Weilheim, Germany). The instrument was calibrated before use with two buffer solutions (pH values of 4.01 and 7.00).

The concentration of Ca^{2+} ions in seawater samples was determined with an ICP-OES Optima 2000TM DV spectrometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) by means of an external calibration curve.

2.4. *Statistical analysis*

The methods described by Batschelet (Batschelet, 1981) for circular distributions were used for statistical analysis. For each distribution we calculated the mean angle (α) with the confidence interval at 95% [as reported by Batschelet (Batschelet, 1981), pp. 84–89] and the length of the mean resultant vector (r) (which ranges between 0 and 1). To test if the distributions differed significantly from randomness we used the Rayleigh test. Comparison between distributions was made by the Watson U^2 test. To give a representation of the ‘goodness of orientation’ (GO), we used the YL [as reported by Batschelet (Batschelet, 1981), pp. 40–42]. Since it weights the cosine of difference between mean angle and expected direction for the mean vector length ($\text{GO} = r \cdot \cos \alpha - \text{YL}$) it ranges between +1 (best orientation and concentration of animals around the expected direction) and –1 (opposite best orientation), passing through 0 (directions uniformly distributed around 360°).

3. RESULTS

Fig. 1 clearly shows that although sandhoppers are well directed towards the expected direction when released in unmodified natural or artificial seawater (Fig. 1A,B), after precipitation of Ca^{2+} they originate random distributions (Fig. 1C) or they show a photopositive behaviour (Fig. 1D). This is true for a Ca^{2+} concentration corresponding to 79.9% of the total (Fig. 1C) and 52.5% of the total (Fig. 1D), respectively, as confirmed by the results of Watson U^2 test (Fig. 1C vs Fig. 1D; $U^2_{(33,31)} = 0.196$, $P < 0.05$).

The differing behaviour of sandhoppers observed in natural and artificial seawater before and after the addition of Na_2CO_3 could be due to the strong decrease of Ca^{2+} and the increase of Na^+ ions in the solution. In order to understand the reason for the sandhoppers behaviour, we prepared basic seawater solutions according to the ‘test solutions’ section of the Materials and methods; these solutions had a constant Na^+ concentration but differed in the absence of one of three major constituent cations (K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+}). The effects of these solutions on sandhopper orientation are reported in Fig. 2.

Releases carried out in basic seawater (Fig. 2B), i.e. in seawater where the main cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , and Na^+) are present at the same concentrations as in natural seawater, show a good clustering around the

expected direction, with only 2 deg. of difference with respect to the distribution obtained by releasing sandhoppers in unmodified artificial seawater (Fig. 2A).

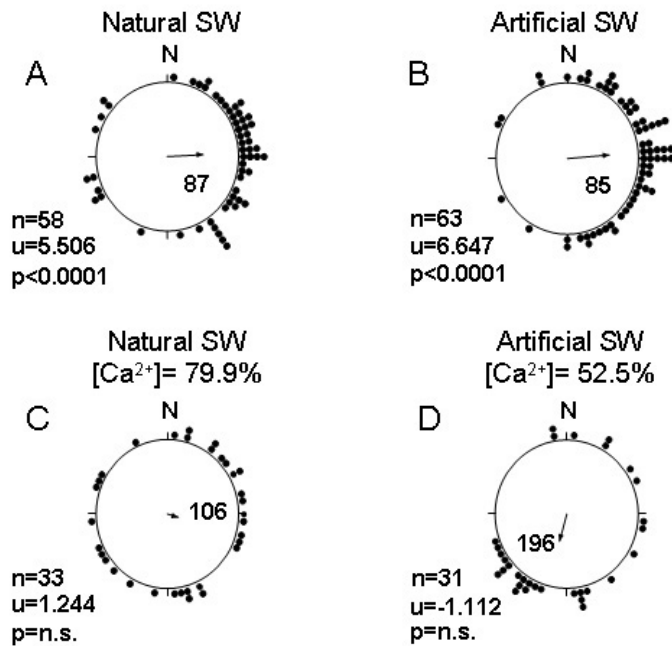


Fig. 1. Solar orientation test in natural and artificial seawater (A,B) and in natural and artificial seawater after modification by adding a solution of 0.1 mol l⁻¹ Na₂CO₃ (C,D). The heading above each distribution summarizes the treatment used in each test. The arrow inside each distribution represents the mean vector with the mean angle; dots represent sandhopper directions (each dot represents one individual); N, magnetic north; sun, azimuth of the sun at the time of the experiments; filled triangle, expected landward direction. In each distribution, the number of samples (N) and the Rayleigh test value (z) with probability level (P) are also reported. The broken lines inside each distribution show the confidence limits at 95%. See text for further explanations.

Therefore, the different concentration of chloride ions between the two test solutions does not affect sandhopper orientation. Distributions obtained releasing sandhoppers in basic seawater without K⁺ (Fig.2C) and without Mg²⁺ (Fig. 2D) show that sandhoppers are still able to maintain the correct landward direction by sun compass orientation. It is easy to note an increase in dispersion when sandhoppers are released in basic seawater without Mg²⁺ (Fig. 2D). However the distribution is statistically different from uniformity. Releases in basic seawater without Ca²⁺ originate a photopositive response (Fig. 2E), as observed previously with a reduction to 52.5% of the total Ca²⁺ concentration (Fig. 1D; see Fig.2E vs Fig.1D) ($U^2_{(54,31)}=0.111$, N.S.).

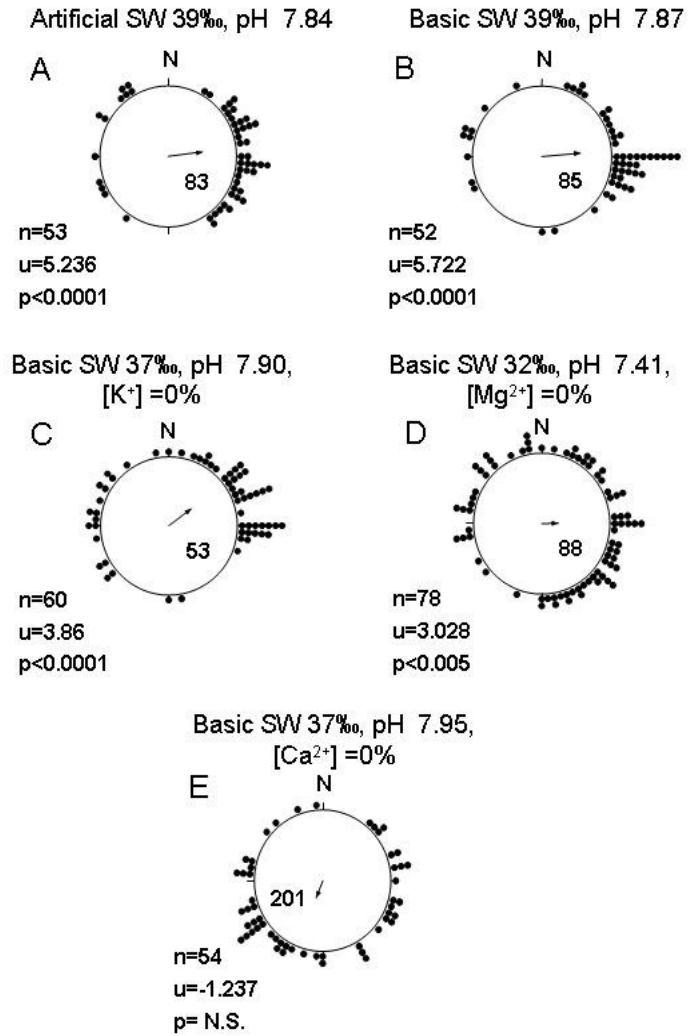


Fig. 2. Solar orientation test in artificial seawater (A) and basic seawater characterized by the presence of the main cations (B) and without K⁺ (C), Mg²⁺ (D) and Ca²⁺ (E). See Fig. 1 and text for Further explanations. Salinity values of basic test solutions are not in terms of NaCl concentration but in terms of chloride ions in solution.

Fig. 3 summarizes the effect of the reduction of Ca²⁺ on the goodness of orientation (GO). There is a strong reduction in GO value in the test carried out using the solution with 79.9% of total Ca²⁺. GO values decrease further with decreasing Ca²⁺ concentration (Fig. 3).

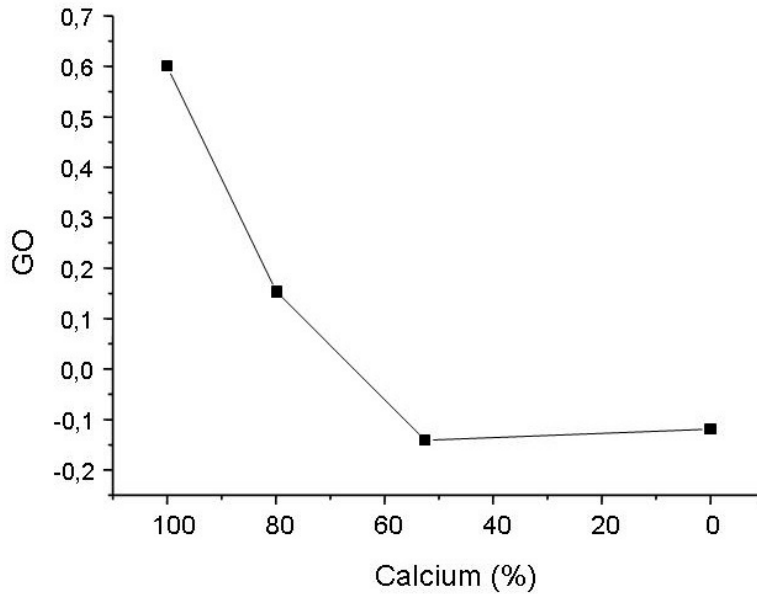


Fig. 3. Goodness of orientation (GO) values for each concentration of Ca^{2+} . See text for further explanations.

The distributions obtained by releasing sandhoppers in artificial seawater with different levels of pH (Fig. 4) (pH from 9.20 to 6.50) are all significantly well directed towards the expected landward direction. The mean vectors of the distributions shown in Fig.4A and Fig. 4B are deflected by a maximum of 33deg. with respect to the expected directions (see Fig.1B as control test). However, despite the difference in pH, their mean angles differ by only 4 deg. (Fig.4A vs Fig. 4B, $U^2_{(39,44)}=0.077$, N.S.). Moreover, no comparison between the distribution of controls (Fig.1B; pH=8.00) and the others are statistically significant (Fig.1B vs Fig. 4A; $U^2_{(63, 39)}=0.172$, N.S.) (Fig. 1B vs Fig. 4B; $U^2_{(63,44)}=0.170$, N.S.).

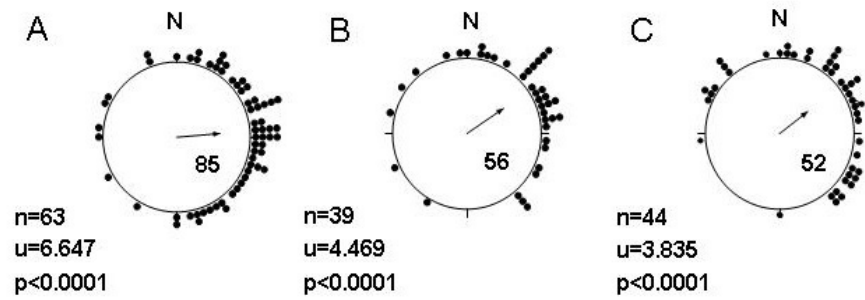


Fig. 4. Solar orientation test at different pH values: (A) pH9.20; (B) pH 6.50. See Fig. 1 and text for further explanations.

Experiments investigating phototaxis using artificial seawater, double-distilled water and basic seawater without Ca^{2+} (Fig. 5) show a constant and clear preference for the illuminated part of the corridor independent of the salinity and presence or absence of Ca^{2+} .

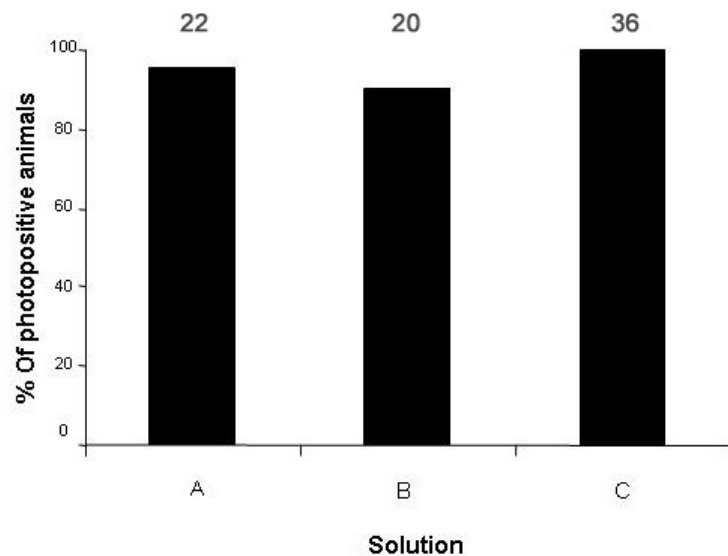


Fig. 5. Phototactic behaviour test. Percentage of photopositive animals tested in (A) artificial seawater, (B) double-distilled water and (C) basic seawater without Ca^{2+} . The number of animals tested is also reported. See text for further explanations.

4. DISCUSSION

Taking into account that in our tests the salinity of artificial and basic seawater is maintained at 32–39‰ and falls within the natural variation of seawater concentration near the shore, results clearly demonstrate that the absence (0%) or even slight reduction (20%) in concentration of Ca^{2+} in the seawater affects the sandhoppers' capacity to use the sun compass mechanism to orientate towards an ecologically efficient direction: the landward direction of the sea–land axis of their home beach. The influence on sandhoppers' behaviour, however, seems to depend on the quantity of calcium dissolved in the water. In fact, the 20% reduction in concentration results in a random distribution of sandhoppers' individual directions, while greater reductions of Ca^{2+} (47.5% or 100%) determine a photopositive behaviour (orientation towards the sun) that could be interpreted as an avoiding response to exit from a stressful situation. The use of the sun compass mechanism does not depend on the pH (see Fig. 4A,B) nor on the salinity in the range adopted in our experiments (see Fig. 1B, Fig. 2A). It is also independent of the presence of the many others ions (e.g. Sr^{2+} , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , NO_3^- , NH_4^+) normally present in natural or artificial seawater (Atkinson and Bingman, 1998), since sandhoppers tested in basic seawater comprising only the main cations (Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} and K^+) are well orientated towards the direction of land and with no relevant difference with respect to controls nor mean angle (only 2 deg. of difference).

Some effect could also be noted for Mg^{2+} and K^+ , even though this is less noticeable compared with the effect of Ca^{2+} . In fact, in the absence of Mg^{2+} , despite causing an increase in dispersion, the mean vector is still well directed towards the expected direction, and the difference in mean angle compared with controls is only 5deg. For K^+ we register a deviation of 30 deg. with respect to the controls. However, in both cases, the distributions are statistically different from uniformity and with the mean vectors directed towards the landward direction.

What is the effect of the absence (reduction) of Ca^{2+} in the seawater on the capacity of solar orientation? It is well known that Ca^{2+} is a very important ion for many aspects of cellular physiology (Wilkins and Wilkins, 2003); therefore, we can (trivially) hypothesize that in our experimental conditions its reduced concentration (1) influenced the visual system cells and/or (2) determined a general bad functioning at the cellular level owing to modification of the external and internal cellular Ca^{2+} concentrations.

The clear photopositive tendency seen in artificial seawater, basic Ca^{2+} -deprived seawater and double-distilled water should indicate that the absence of Ca^{2+} does not affect the normal functioning of the visual cells, at least in our experimental conditions. Moreover, it should be remembered that *T. saltator* is a quite strong hyper–hypo regulator of osmotic and ionic concentration (Morritt, 1988; Morritt, 1989; Calosi et al., 2007). Therefore, without excluding any hypothesis, and taking into account the reduced time spent in the modified

seawater by *T. saltator* during the experiments (maximum of 7.15 min), we believe that neither of the above two hypotheses are likely. A third hypothesis could consider the important role of Ca^{2+} on the regulation of nitric oxide (NO) production in the central nervous system level. In this case, an alteration of the Ca^{2+} concentration could affect the efficient functioning of the sun compass mechanism in one or both of its components: the compass direction and/or the chronometric mechanism. In fact, it is well known that NO production influences many important functions, such as neurotransmission, neuromodulation, learning and memory formation (Martinez, 1995; Jacklet, 1997; Müller, 1997; Colasanti and Venturini, 1998). In particular, in crustaceans it has been demonstrated that the NO/cGMP pathway is associated with the organization and production of motor behaviour (Scholz, 2001).

In conclusion, frankly speaking, we do not yet have any real explanation for our findings from the physiological point of view, but we can say that Ca^{2+} seawater concentration is important for the correct functioning of one of the principal mechanisms of orientation in supralittoral amphipods and therefore it is important for their survival in the field.

Acknowledgments

The research was funded by the Fondazione Monte dei Paschi, Siena, Italy (Grant 31017). We wish to thank Prof. T. Haryama (Hamamatsu University) for stimulating discussion and the Ente Parco Regionale Migliarino San Rossore Massaciuccoli for the authorization for sampling.

5. REFERENCES

- Atkinson, M.J. & Bingman, C. 1998. Elemental composition of commercial seasalts. *Journal of Aquaculture*, **8**, 39-43.
- Batschelet, E. 1981. *Circular Statistics in Biology*. Academic Press, London, New York.
- Calosi, P., Morritt, D., Chelazzi, G. & Ugolini, A. 2007. Physiological capacity and environmental tolerance in two sandhoppers species with contrasting geographical ranges: *Talitrus saltator* and *Talorchestia ugolinii*. *Marine Biology*, **151**, 1647-1655.
- Colasanti, M. & Venturini, G. 1998 Nitric oxide in invertebrates. *Molecular Neurobiology*, **17**, 157-174.
- Dorloechter, M. & Stieve, H. 1997. The Limulus ventral photoreceptor: light response and the role of calcium in a classic preparation. *Progresses in Neurobiology*, **53**, 451- 515.
- Forward, R. B., Jr 1989. Behavioural responses of crustacean larvae to rates of salinity change. *Biological Bulletin*, **176**, 229-238.
- Harges, P. L. & Forward, R. B. Jr 1982. Salinity perception by larvae of the crab *Rhithropanopeus harrisii* (Gould). *Marine Behaviour and Physiology*, **8**, 311-331.

- Jacklet, J. W.** 1997. Nitric oxide signaling in invertebrates. *Invertebrate Neuroscience*, **3**, 1-14.
- Kinne, O.** 1963a. Salinity, osmoregulation and distribution in macroscopic crustaceans. *Royal Society of Canada Special Publication*, **5**, 95-105.
- Kinne, O.** 1963b. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. *Oceanography and marine biology: An Annual Review*, **1**, 301-340.
- Martinez, A.** 1995. Nitric oxide synthase in invertebrates. *The Histochemical Journal*, **27**, 770-776.
- Morel-Laurens, N.** 1987. Calcium control of phototactic orientation in *Chlamydomonas reinhardtii*: sign and strength of response. *Photochemistry and Photobiology*, **45**, 119-128.
- Morritt, D.** 1988. Osmoregulation in littoral terrestrial talitroidean amphipods (Crustacea) from Britain. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **123**, 77-94.
- Morritt, D.** 1989. Ionic regulation in littoral and terrestrial amphipods (Crustacea: Amphipoda: Talitridae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **132**, 53-67.
- Müller, U.** 1997. The nitric oxide system in insects. *Progresses in Neurobiology*, **51**, 363-381.
- Papi, L. & Pardi, F.** 1953. Ricerche sull'orientamento di *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea Amphipoda). II. Sui fattori che regolano la variazione dell'angolo di orientamento nel corso del giorno. L'orientamento di notte, L'orientamento diurno di altre popolazioni. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, **35**, 490-518.
- Pardi, L. & Ercolini, A.** 1986. Zonal recovery mechanisms in talitrid crustaceans. *Bollettino di Zoologia*, **53**, 139-160.
- Pardi, L. & Papi, F.** 1952. Die sonne als kompass bei *Talitrus saltator*. *Naturwissenschaften*, **39**, 262-263.
- Pardi, L. & Papi, F.** 1953. Ricerche sull'orientamento di *Talitrus saltator* (Montagu)(Crustacea Amphipoda). I. L'orientamento durante il giorno di una popolazione del litorale tirrenico. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, **35**, 459-489.
- Scapini, F.** 1979. Orientation of *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea Amphipoda) in fresh, sea and diluted seawater. *Monitore Zoologico Italiano*, **13**, 71-76.
- Scholz, N. L.** 2001. NO/cGMP signaling and the flexible organization of motor behavior in crustaceans. *American Zoologist*, **41**, 292-303.
- Terracini-Debenedetti, E.** 1963. Preliminary observations on the orientation of *Talitrus saltator* in fresh and seawater. *Naturwissenschaften*, **50**, 25-26.
- Ugolini, A. & Macchi, T.** 1988. Learned component in the solar orientation of *Talitrus saltator* Montagu (Amphipoda: Talitridae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **121**, 79-87.

Wilkins, R. G. & Wilkins, P. C. 2003. *The Role of Calcium and Comparable Cations in Animal Behaviour*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.

CAPITOLO 9

The amphipod *Talitrus saltator* as a bioindicator of human trampling on sandy beaches

I dati presentati in questo capitolo sono stati oggetto di pubblicazione: A. Ugolini, G. Ungherese, S. Somigli, G. Galanti, D. Baroni, F. Borghini, N. Cipriani, M. Nebbiai, M. Passaponti, S. Focardi, 2008, “**The amphipod *Talitrus saltator* as a bioindicator of human trampling on sandy beaches**” Marine Environmental Research, Vol. 65, 349-357.

ABSTRACT

The present paper assesses the use of the supralittoral amphipod *Talitrus saltator* as a bioindicator of the effects of human trampling on the supralittoral sandy band. Samplings in delimited areas were carried out at sites subjected to different human impact. The results showed a strong negative correlation between the number of swimmers and the sandhopper population density, while there was no clear relationship between sandhopper abundance and the other factors considered: granulometry, compactness and organic carbon content of the sand, and trace metal contents in the sand and sandhoppers. A field test of trampling conducted in a confined space showed its direct negative effect on sandhopper survival. However, trace metal analysis confirmed the ability of *T. saltator* to bioaccumulate some elements (Hg, Zn, Cu, Cd). Our study demonstrates that *T. saltator* is a good bioindicator of human impact in the supralittoral zone of sandy shores.

Keywords: Human trampling, Heavy metals, Mediterranean sandy shores, Beaches, Bioindicator, Amphipod; *Talitrus saltator*.

1. INTRODUCTION

In the coastal zone, the input of materials and substances from terrestrial, fluvial and marine sources is particularly important. In addition to elevated concentrations of nutrients, there can be increased quantities of natural and anthropogenic contaminants. Since the 1960s, European shores (particularly Italian ones) have seen a very strong increase in the number of swimmers at beach resorts. Many studies on the submerged and intertidal littoral environment of rocky and sandy shores have dealt with the use of organisms as biomonitors of trace metal contamination. Similarly, many investigations have attempted to evaluate the effects of human trampling and recreational uses on natural populations and communities of the littoral zone of sandy shores (see Milazzo et al., 2002 for a review). In contrast, the supralittoral band, an ecotonal environment of great ecological importance in the economy of sandy shore ecosystems, has received relatively little attention (see Brown and McLachlan, 1994; Schlacher et al., 2007).

Most research on the effects of trampling on natural communities concerns the vegetation or macrofaunal components (especially birds) (Liddle, 1975; Brown and McLachlan, 1994). Several studies have examined the effects of trampling on the invertebrate fauna of rocky shores or of loose substrata of the intertidal zone (for instance see Povey and Keough, 1991; Brosnan and Crumrine, 1994; Chandrasekara and Frid, 1996; Casu et al., 2006; Dye, 2006; Johnson et al., 2007). Instead, there have been very few investigations of the supralittoral fauna of sandy shores and the results of these studies have been contradictory (Jaramillo et al., 1996; Moffet et al., 1998; Weslawski et al., 2000b, 2000c; Veloso et al., 2006). Recent studies have attempted to establish the utility of supralittoral amphipods as indicators of the impact of tourist activities on sandy shores (Fanini et al., 2005). However, because of their methods and sampling sites, the investigations have not provided clear results.

In summer, the supralittoral zone is intensely frequented by swimmers but it is also where the major consumers of stranded organic material, i.e. talitrid amphipods and isopod, find shelter during the day, buried in the wet sand. In fact, most of the energy flow deriving from the use of stranded material passes through supralittoral crustaceans (Branch and Branch, 1981; Griffiths et al., 1983; Brown and McLachlan, 1994). Sandhoppers occupy a trophic niche as detritivores and collector-gatherers. Hence they feed on plant and animal material from both marine and terrestrial sources (Palluault, 1954; Wildish, 1988; Bergerard, 1989), integrating the two routes of contamination of the supralittoral.

The aims of the present study were to examine the possibility of using the amphipod *Talitrus saltator* as a bioindicator of the effects of human trampling on the supralittoral of sandy shores and to provide a simple low-cost monitoring tool. For this reason the relationship between sandhoppers abundance and swimmers has been considered, as well as the possible influence

of some other factors such as granulometric composition and sand compactness, organic carbon content in the sand and trace metal contamination.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *Sandhopper sampling*

Samplings to determine the density of sandhoppers were carried out at eight sites on the coast of Tuscany subjected to different tourist impact and either with or without beach cleaning procedures. In the five sites inside the Regional Park of Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli (MSRM Park, Pisa), the sampling was performed once a month from June to September 2004, 2005 and 2006:

O1: Oasi 1 (cleaned beach).

SM: Serchio Mare (seashore, not cleaned).

SF: Serchio Fiume (right bank of river mouth, not cleaned).

BV: Batteria Vecchia (not cleaned).

FM: Fiume Morto Vecchio (not cleaned).

At the three sites along the Feniglia sandbar (southern Tuscany, Grosseto), the sampling was performed in July and September 2005:

FA: Bathhouse (Ansedonia side, cleaned beach).

FB1: Beach ca. 1 km from FA (cleaned).

FB2: Beach ca. 2 km from FA (cleaned).

At each sampling, all the sandhoppers were captured (also disturbing the surface layer to sample those in the sediment) and counted inside four areas (75 cm² each) delimited by plastic containers inserted a few cm into the sand. Each container was inserted along the sea–land axis of the beach at a progressively increasing distance starting from the water line until the beginning of dry sand. At each site, the sampling was carried out twice, a few meters apart, since the distribution of sandhoppers in the band of wet sand does not seem to be uniform (Weslawski et al., 2000a).

At each sampling site, the people to the right and left of the shoreline, along a 150 m transect in the central hours of the day on the days with the highest tourist presence, were also counted (Saturday and Sunday). At some locations, the following factors were also analyzed to exclude differences between the sampling sites: (1) contents of trace metals in the sand and in the sandhoppers (Hg, Cr, Cd, Cu, Zn, Fe, Al, Pb); (2) compactness of the sand; (3) granulometric composition of the sand; (4) organic carbon content of the sand.

2.2 *Trace metals*

The trace metal analysis was conducted on sand samples collected from the zone frequented by the sandhoppers during the day and on adult individuals of *T. saltator* collected at all the sites. The animals were transported to the laboratory in plastic containers with sand and detritus from the sampling site and then sacrificed by freezing. At each site, a sample of sand was collected in the zone frequented by the sandhoppers during the day. We dehydrated the samples at 40 °C until they reached a constant weight and then were finely ground. Around 150 mg of each sample were mineralized in Teflon vessels containing 3 ml of HNO₃ at 120 °C for 8 h. After digestion, the solution was brought to a volume of 10 ml by addition of deionized water. During each mineralization, we performed several “blank trials”, by putting only the reagents in the Teflon containers, to verify the absence of contamination.

The analyses were performed by atomic absorption spectrometry. Cd, Cr, Cu and Pb were determined by atomization with a graphite furnace and Zeeman background corrector. The FIMS (flow injection mercury system) was used for Hg, while we determined Al, Fe and Zn by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP/EAS). Each analysis was carried out three times and the accuracy of the analytical procedures was assessed by comparing the results of contemporary digestions and analyses of standard reference materials, SRMs: SRM 1566a “oyster tissue” from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, USA). The results of the determination were only accepted if the values measured for the SRMs were within the certified concentration range; if not, we repeated the analyses. The element concentrations (expressed as µg/g) were calculated by the method of “internal additions”. The coefficients of variation for the various elements were between 5% and 10%.

2.3. *Granulometric composition and sand compactness*

For the granulometric analysis, the sand samples were split to obtain samples of approximately 10 g (the choice of the representative volume was based on the median of the sediment, as estimated by visual examination).

A statistically representative portion of the sample was placed in an oven at 80 °C to eliminate the humidity, after which we sifted the material through a series of progressively finer sieves (2500 µm, 1600 µm, 1000 µm, 630 µm, 400 µm, 250 µm, 160 µm, 100 µm, 63 µm) for around 5 min with a Ro-Tap shaker. Since the samples were prevalently sandy, it was not necessary to analyze the mud-clay fraction (<63 µm) of the sediment.

To assess the compactness of the sand in the zone frequented by sandhoppers during the day, an aluminum pole was dropped from a height of 1 m and the distance the pole penetrated into the sand was measured. The distance was transformed into arbitrary units by assigning a value of 100% compactness to 0 cm and 50% compactness to 10 cm.

2.4. Organic carbon

The sand samples were collected at each site in July 2006. The organic carbon in the sand samples was determined as the difference between the total carbon and the inorganic carbon. The sand was crushed to a fine powder so as to homogenize the sample. Total carbon was determined with a CHNS/O ANALYZER (mod. 2400 ser. II, Perkin Elmer), while inorganic carbon was measured with a De Astis calcimeter.

2.5. Trampling test

The trampling test was carried out at Fiume Morto Vecchio (MSRM Park). Two plastic cylinders (110 cm diameter) were fixed in the sand in the wet band frequented by sandhoppers during the day. All the individuals inside each of the delimited areas were captured, counted and then freed within the same area. After around 15 min (sufficient time for the sandhoppers to return to their refuges in the wet sand), two people performed 400 footsteps in 15 min inside one of the two cylinders. The number of footsteps was chosen on the basis of the footsteps recorded during a survey carried out from 11:00 to 12:00 on a Saturday in July 2006 on the Marina di Pietrasanta beach (a popular beach on the Tuscan coast). During this survey, a mean transit of 866 swimmers per hour at a selected point on the shoreline was recorded. The sandhoppers within the other cylinder were left undisturbed. At the end of the trial, the sandhoppers still alive in both cylinders were captured, counted and transported to the laboratory in basins with wet sand. The numbers of individuals still alive 24 h after the treatment was also recorded.

2.6. Statistical analysis

The granulometric data were analyzed with specific software (Department of Earth Sciences, University of Florence) that provided parametric statistics indicative of the sorting of the samples, as well as the percentages of the granulometric classes for the purposes of textural classification (Shepard, 1954).

The statistical analysis of sandhopper density was performed independently of an analysis of natural population fluctuations (see Anastácio et al., 2003; Marques et al., 2003) and/or a comparison of the population densities at different sites. Such analyses were beyond the scope of our study and would not have provided information useful for our aims. It is possible that sandhopper populations living in the same environment and practically at the same latitude (ca. 200 km apart) present small differences in the natural fluctuation of population density. However, since we performed relative comparisons of the number of captured individuals among several localities of the same zone, any differences in population density between different zones in the same period of the year would not affect the interpretation of the results. The tests used are among the most common ones in non-parametric statistics (Zar, 1984; Siegel and Castellan, 1989).

The possible influence of trace metal pollution on sandhopper density was assessed with the Spearman rank-order correlation coefficient test (Siegel and Castellan, 1989). In the figure illustrating trace metal pollution, we arranged the sampling sites in decreasing order of sandhopper density: the site with the highest sandhopper abundance in July 2006 (FM, captured sandhoppers = 1013) was given the arbitrary value of 100. The values for the other sites were expressed as a percentage of FM.

3. RESULTS

3.1. Sandhopper density

The frequency of *T. saltator* individuals collected at the MSRM Park sites was negatively correlated with the frequency of swimmers (Fig. 1).

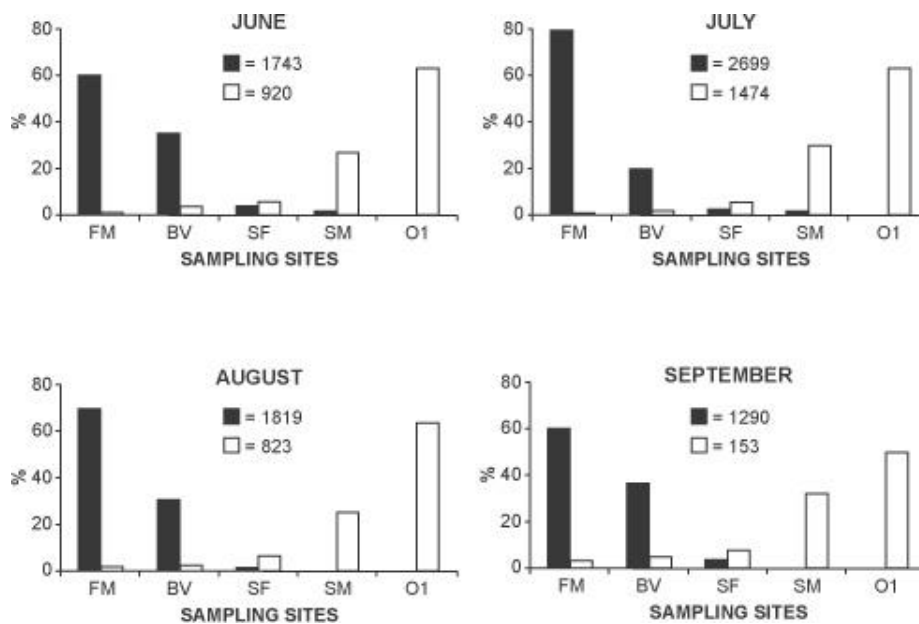


Fig. 1. Frequency (% of total numbers) of captured sandhoppers (black bars) and swimmers (white bars) for each month of sampling. The order of the sampling sites is based on the number of swimmers observed at each locality: FM = Fiume Morto; BV = Batteria Vecchia; SF = Serchio Fiume; SM = Serchio Mare; O1 = Oasi 1. The total numbers of sandhoppers and swimmers at all five sites are also given.

Despite the small sample sizes, statistical significance was reached for each of the four months (June–September) (June and July, $r_s = -1$, $n = 5$, $p = 0.01$; August and September, $r_s = -0.925$, $n = 5$, $p < 0.05$, Spearman rank-order

correlation coefficient test, Fig. 1). This is also confirmed considering the mean number of sandhoppers and swimmers (Tab. 1). In fact, the Fiume Morto Vecchio site (FM) consistently had the lowest tourist impact and the highest sandhopper abundance (Table 1). In contrast, no sandhoppers were found at the site with the highest tourist impact, Oasi 1 (Tab. 1).

Tab. 1 Captured sandhoppers and number of swimmers (mean \pm SD; n = 3) for each month of sampling

Sampling sites		June	July	August	September
FM	sandhoppers	348.3 \pm 59	709 \pm 332	438 \pm 466	256 \pm 325
	swimmers	1.3 \pm 1.5	4 \pm 2	3.6 \pm 4.4	1.66 \pm 1.5
BV	sandhoppers	204 \pm 85	174 \pm 40	184.6 \pm 104	158 \pm 192
	swimmers	10 \pm 13	6 \pm 2.6	6.6 \pm 9	1.3 \pm 1.5
SF	sandhoppers	21 \pm 31	15 \pm 15	2.3 \pm 4	16.3 \pm 18
	swimmers	18 \pm 19	25.6 \pm 15	18.6 \pm 12	4.3 \pm 5
SM	sandhoppers	8 \pm 12	1.33 \pm 1.5	0	0
	swimmers	82 \pm 70	146 \pm 137	70 \pm 21.2	16.6 \pm 13.5
O1	sandhoppers	0	0	0	0
	swimmers	196 \pm 190	310 \pm 134	175 \pm 76	28.6 \pm 17.8

The July vs. September comparison for the various sampling sites was statistically significant for the localities in the MSRM Park ($G = 114.5$, $df = 4$, $p < 0.001$, Fig. 1) but not for the sites on the Feniglia sandbar ($G = 1.9$, $df = 2$, $p > 0.1$, G test, Fig. 3).

There was a significant monthly difference in sandhopper abundance even at a single locality with very low tourist impact (Fiume Morto Vecchio, Table 1, Fig. 2, $G = 664$, $df = 1$, $p < 0.001$, G test) due to the natural population fluctuation. However, these differences did not affect the swimmers–sandhoppers relationship.

It was not possible to make statistical comparisons for the Feniglia sandbar (Fig. 3) because of the small number of sampling sites. Nevertheless, the number of sandhoppers captured at the Feniglia sites clearly followed the same trend in relation to tourist impact as the one recorded at the MSRM Park sites, i.e. localities with higher tourist impact had lower *T. saltator* densities.

Regarding the possible influence of beach cleaning on sandhopper survival, there was a significant difference between the only cleaned site (O1, $n = 0$) and the total of the other MSRM sites (SM + SF + BV + FM, $n = 7551$; $G = 10,434$, $df = 1$, $p < 0.0001$, G test). However, there were also significant

differences among the not cleaned sites (SM, $n = 28$; SF, $n = 164$; BV, $n = 2160$; FM, $n = 5199$; $G = 10,077$, $df = 3$, $p < 0.0001$, G test). A similar result was obtained for the cleaned beaches of the Feniglia sandbar (FA, $n = 131$; FB1, $n = 41$; FB2, $n = 3$; $G = 164$, $df = 2$, $p < 0.01$, G test).

3.2. Trace metals

At the sites with sandhoppers, the Cu, Cd, Hg and Zn concentrations (Fig. 4) were constantly higher in the sandhoppers than in the sand. In contrast, the Fe, Pb and Al contents (Fig. 4) were higher in the sand than in the sandhoppers. For Cr, there was a higher concentration in the sandhoppers at two sites and in the sand at the other two sites.

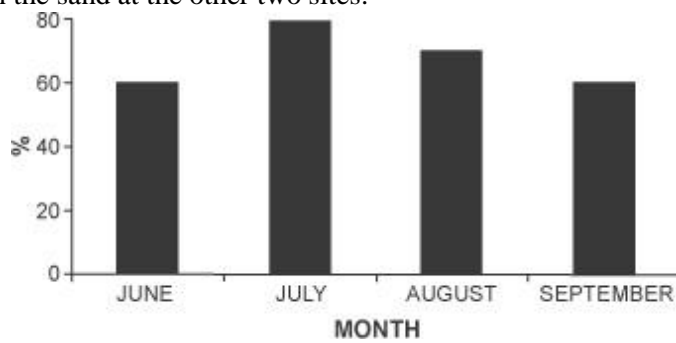


Fig. 2. Monthly variation of sandhopper numbers (% of total sampled) at Fiume Morto (FM). Total number of sandhoppers collected = 5199.

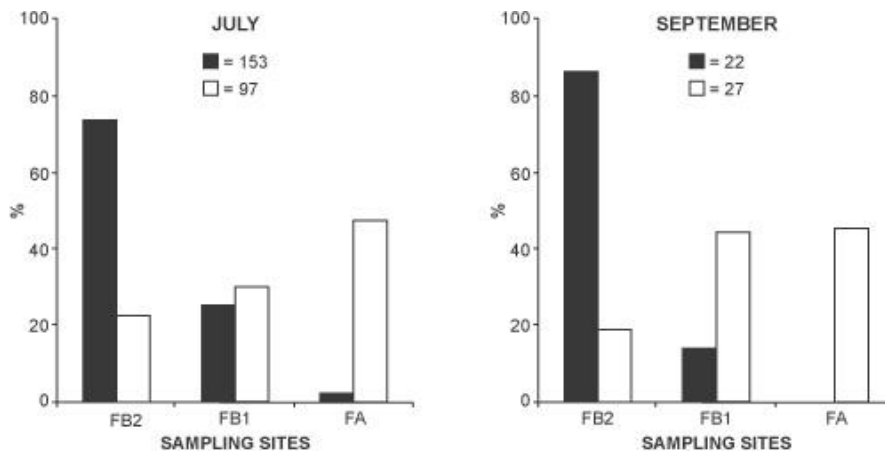


Fig. 3. Frequency (% of total numbers) of captured sandhoppers (black bars) and swimmers (white bars) along the Feniglia sandbar in July and September. The order of the sampling sites is based on the number of swimmers observed at each locality: FA = Feniglia bathhouse, FB1 = 1 km from bathhouse, FB2 = 2 km from bathhouse. The total numbers of sandhoppers and swimmers at all three sites are also given.

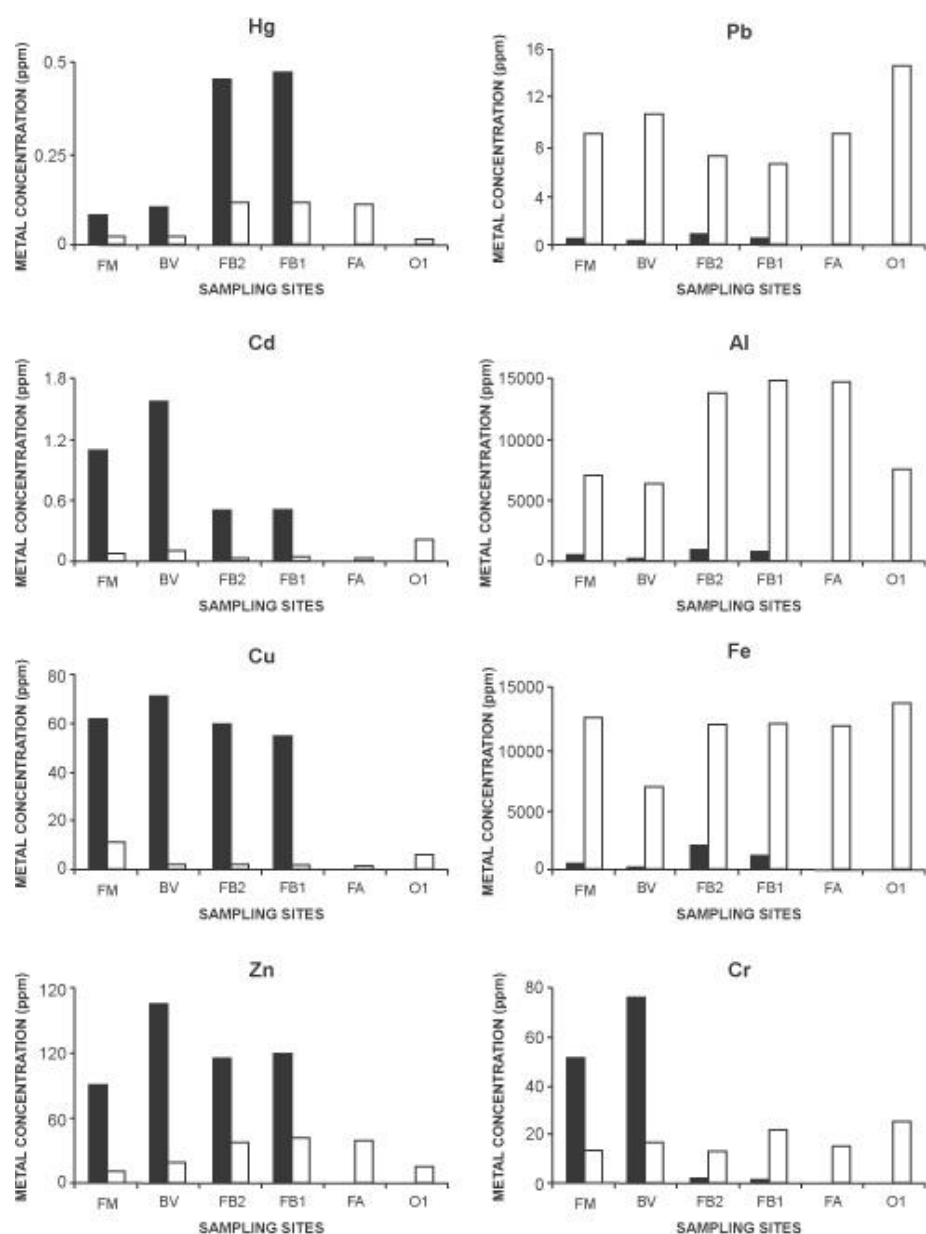


Fig. 4. Trace metal concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt) in the sand (white bars) and in the sandhoppers (black bars). For each element, the sampling sites are ordered according to decreasing frequency of sandhoppers recorded in July 2006. For further explanations, see Figs. 1 and 3 and text.

There was no significant correlation between sandhopper abundance (in Fig. 4 abscissa, the sites are in decreasing order of abundance) and trace metal contents in the individuals or in the sand ($p = \text{NS}$ in each case, $n = 6$, Spearman rank-order correlation test).

3.3. *Granulometric composition and sand compactness*

The granulometric composition of the sand was fairly uniform among sites: all samples were well classified and in the medium- to coarse-grained range (Table 2). For the MSRM Park sites, there was no correlation between mean sand grain diameter and sandhopper density (Spearman rank-order correlation coefficient test, $r_s = -0.1$, $n = 5$, $p = \text{NS}$, Fig. 5A). A qualitative evaluation also suggested a lack of correlation between sandhopper abundance and mean sand grain diameter at the Feniglia localities (Fig. 5B). Sand compactness at the MSRM Park sites (Fig. 5C) was not significantly correlated with the number of sandhoppers ($r_s = -0.175$; $n = 5$, $p = \text{NS}$, Spearman rank-order correlation coefficient test). Indeed the highest values occurred at site SF where sandhoppers were present (Fig. 5C). For the Feniglia sites, a qualitative evaluation indicated a negative correlation between sand compactness and sandhopper abundance (Fig. 5D).

Tab. 2 Results of the granulometric analysis for each sampling site.

Sampling sites	Mean sand grain diameter (mm)	Standard deviation	Skewness	Kurtosis
FM	1.605	0.471	-0.012	0.503
BV	1.324	0.507	0.247	0.494
SF	1.751	0.506	0.180	0.598
SM	1.669	0.469	0.051	0.582
O1	1.484	0.486	0.170	0.543
FB2	1.738	0.436	0.234	0.631
FB1	2.166	0.435	-0.043	0.511
FA	2.032	0.489	0.065	0.552

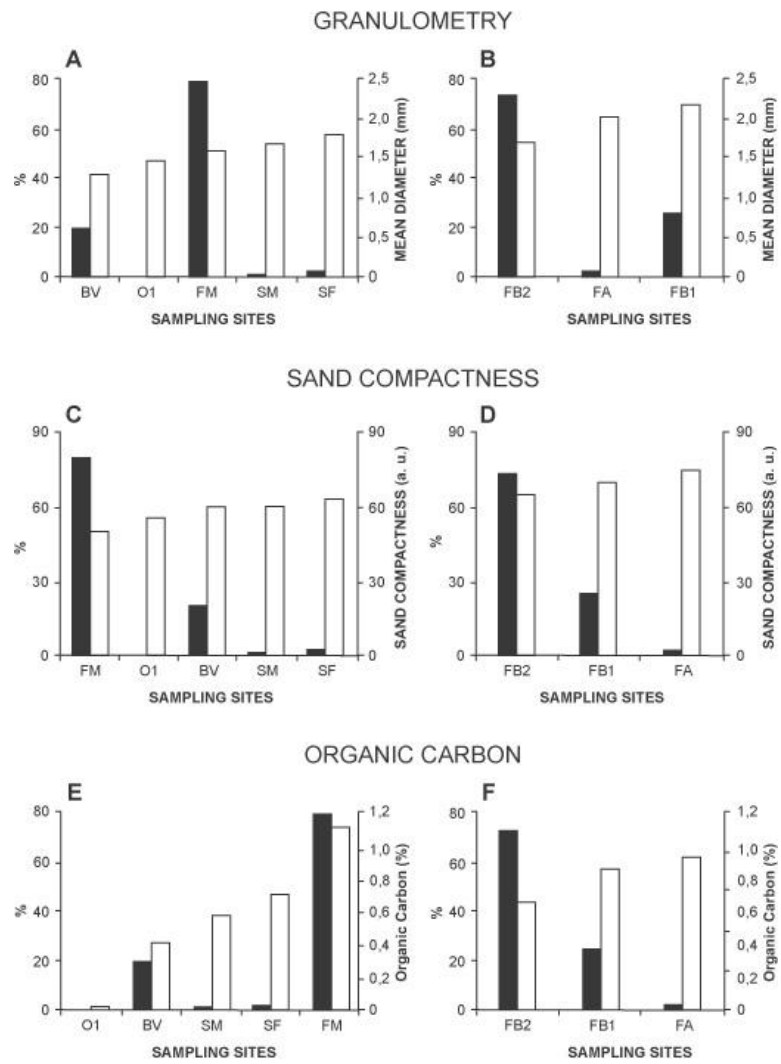


Fig. 5. A–B: mean sand grain diameter (white bars) and frequency of captured sandhoppers (black bars; % of total numbers). The order of the sampling sites is based on mean diameter. C–D: sand compactness (white bars) expressed in arbitrary units (a.u.) and frequency of captured sandhoppers (black bars). The order of the sampling sites is based on sand compactness. E–F: percentage of organic carbon in the sand (white bars) and frequency of captured sandhoppers (black bars). The order of the sampling sites is based on percentage of organic carbon. For further explanations, see Figs. 1 and 3.

3.4. Organic carbon

For the MSRM Park sites, the organic carbon content of the sand was not significantly correlated with sandhopper density ($r_s = 0.7$, $n = 5$, $p = \text{NS}$; Spearman rank-order correlation coefficient test, Fig. 5E). However, the localities along the Feniglia sandbar showed a negative correlation between the two parameters (Fig. 5F).

3.5. Trampling test

The effect of trampling on *T. saltator* survival (Fig. 6) was evident immediately after the treatment: the difference between the number of live individuals before and after treatment was highly significant ($G = 86$, $df = 1$, $p < 0.001$, G test). After 24 h, the percentage of surviving sandhoppers dropped almost to zero ($G = 428$, $df = 1$, $p < 0.001$, G test) while the survival of the control sandhoppers remained the same.

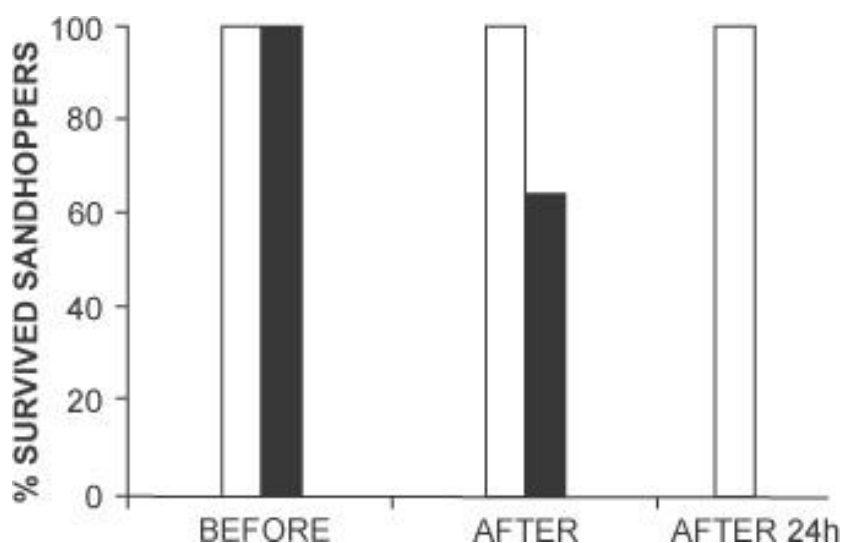


Fig. 6. Frequency of surviving sandhoppers subjected to the trampling test (black bars) and controls (white bars). Before = before the test, After = after the test, 24 h = 24 h after the beginning of the test. See text for further details.

4. DISCUSSION

Of all the factors that might have negatively influenced the population density of *T. saltator*, only the number of swimmers showed a significant correlation with the number of captured sandhoppers. Although the effect of trampling in a confined test space is probably not the same as in natural conditions (in which case the animals could escape), our test results are the first direct proof that human trampling affects sandhopper survival. This is likely an important factor at Mediterranean latitudes and for species that burrow only slightly into the sand (ca. 3–5 cm depth).

This does not mean that other factors are never influential, only that they are not particularly important in the conditions encountered in this study. Sand compactness probably has a negative effect on sandhopper abundance beyond a certain threshold: a particularly compact substrate could hinder burrowing, thus reducing the probability of survival. However, sites like BV and SF, where sandhoppers were present, had more compact sand than O1, where sandhoppers were never found. The negative correlation at the Feniglia sites probably depended on the fact that the increasing order of sand compactness at the sites corresponded to an increasing order of tourist impact. Furthermore, the sand compactness at O1, where sandhoppers were absent, was lower than at FB2 and FB1 where sandhoppers were present. Therefore, sand compactness does not seem to be a primary determinant of *T. saltator* population density.

There did not appear to be any relationship between sandhopper abundance and sand grain size at the various sites. In fact, *T. saltator* lives on beaches with sand that ranges from medium- to coarse-grained (i.e. from around 0.5–2 mm, Ugolini et al., 1995). All the locations considered in this study fell within this range.

The results for organic carbon suggested a negative correlation with sandhopper abundance at the Feniglia sandbar sites. However, as for sand compactness, the increasing order of organic carbon content at the sites corresponded to an increasing order of tourist impact. In addition, the FM site (MSRM Park) had a high sandhopper abundance but a higher organic carbon content than at FA where there were very few sandhoppers (but many swimmers).

The trace metal analysis confirmed *T. saltator*'s good ability to bioaccumulate Hg, Cu, Cd and Zn (Rainbow and Moore, 1986; Moore and Rainbow, 1987; Rainbow, 1998; Rainbow et al., 1998a, 1998b; Marsden and Rainbow, 2004; Ugolini et al., 2004, 2005). Although there were some differences in trace metal contamination among sites, there was no clear relationship with the abundance of sandhoppers. Hg accumulation seemed to be negatively correlated with sandhopper abundance at the various sites (Fig. 4). Nevertheless, the Hg concentration in the sand was lowest at O1 where there were no sandhoppers. Thus, the absence of sandhoppers at O1 and the low

density at FA cannot be attributed to Hg contamination. Furthermore, the trace metal concentrations in both the sandhoppers and sand samples were much lower than those sandhoppers or beachflies were present (Rainbow et al., 1998a, 1998b; Fialkowski et al., 2000; Ugolini et al., 2004).

Since we did not evaluate the effects of beach cleaning separately from the effects of trampling, we cannot exclude a possible influence of beach cleaning on sandhopper density. Nevertheless, at the sampling sites not subjected to mechanical beach cleaning, sandhopper abundance still varied in relation to the different tourist impact. In fact, the sandhopper distributions along the Feniglia sandbar (where the beach is regularly cleaned) and at Fiume Morto Vecchio and Batteria Vecchia (where beach cleaning is not carried out) all presented the same pattern in relation to the numbers of swimmers. Therefore, contrary to the hypothesis of Fanini et al. (2005), trampling rather than beach cleaning has a negative effect on the survival of sandhoppers. We can also add a qualitative datum: at site O1, the one with the highest tourist impact in the MSRM Park, we never captured any sandhoppers during the present research, whereas hundreds of sandhoppers were regularly collected around 25 years ago when the zone had no beach resorts and swimming was forbidden.

We studied populations living within 200 km of each other and thus subject to very similar general climatic and environmental conditions. Therefore, the natural fluctuations of population density are probably synchronous. In any case, since the proposed method is based on the comparison of densities recorded at the various sites in the same time period, it is independent of natural population fluctuations and does not require biodiversity estimates for the considered environment. Hence, the method is simple and low-cost. Other recently proposed methods using sandhoppers to assess human disturbance are based on quantification of the variability of spatialtemporal habitat use (ElGtari et al., 2002; Nardi et al., 2003; Fanini et al., 2005; Scapini et al., 2005) or on determination of the degree of genetic variability (Ketmaier et al., 2003). However, *T. saltator*'s high behavioral plasticity and remarkable ability to learn new directions of the sea-land axis of the beach (see Ugolini and Macchi, 1988; Ugolini and Scapini, 1988; Ugolini et al., 1988) prevent a reliable and rapid determination of the reasons for variability in orientation behavior. The determination of genetic variability is interesting but not easily performed. Therefore, since these methods require specific expertise in various fields, sophisticated analytical techniques and complex statistical analyses, their practical application appears to be problematic.

The effect of human trampling and heavy tourist use of beaches on sandhopper populations raises the question of their conservation. *T. saltator* is a good osmoregulator (Morritt, 1988; Calosi et al., 2007) and metapopulations of this species are also found on the shores of retrodunal pools and on riverbanks near the mouth (Ugolini and Macchi, 1988; Ugolini and Scapini, 1988; Ugolini

et al., 1988). These places are usually shunned by swimmers and if protected could be valid reserves for natural (spontaneous migrations) or artificial sandhopper repopulation of the adjacent beaches.

In conclusion, (1) our method is reliable and low-cost, (2) *T. saltator* is a good biomonitor of trace metal pollution (Cu, Hg, Zn, Cd), and (3) this species is a valid bioindicator of the effects of human trampling and could be used for ecocompatible management of the tourist impact on the supralittoral zone.

Acknowledgments

The research was funded by the Fondazione Monte dei Paschi (Siena) (Grant 31017), Ente Parco Regionale di Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli (Pisa), Centro Interuniversitario di Biologia Marina (CIBM, Livorno) and the University of Florence (local funds ex-60%) assigned to A.Ugolini.

5. REFERENCES

- Anastácio, P.M., Gonçalves, S.C., Pardal, M.A. & Marques, J.C. 2003. A model for amphipod (*Talitrus saltator*) population dynamics. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **58** (Suppl. 1), 149–157.
- Bergerard, J. 1989. Ecologie des laisses de marée. *Année Biologique* **28**, 39–54.
- Branch, G. & Branch, M. 1981. *The Living Shores of Southern Africa*. G. Struik Publication, Cape Town, South Africa.
- Brosnan, D.M. & Crumrine, L.L. 1994. Effects of human trampling on marine rocky shore communities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **177**, 79–97.
- Brown, A.C. & McLachlan, A. 1994. *Ecology of Sandy Shores*. Elsevier, Amsterdam.
- Calosi, P., Morritt, D., Chelazzi, G. & Ugolini, A. 2007. Physiological capacity and environmental tolerance in two sandhoppers species with contrasting geographical ranges: *Talitrus saltator* and *Talorchestia ugolinii*. *Marine Biology* **151**, 1647–1655.
- Chandrasekara, W.U. & Frid, C.L.J. 1996. Effects of human trampling on tidalflat infauna. *Aquatic Conservation: Marine Freshwater Ecosystems*, **6**, 299–311.
- Casu, D., Ceccherelli, G., Curini-Galletti, M. & Castelli, A. 2006. Human exclusion from rock shores in a Mediterranean marine protected area (MPA): an opportunity to investigate the effects of trampling. *Marine Environmental Research*, **62**, 15–32.
- Dye, A.H. 2006. Persistent effects of physical disturbance in mangrove sediments. *Marine Environmental Research*, **62**, 341–355.
- ElGtari, M., Charfi-Chikhrouha, F., Marchetti, G.M. & Scapini, F. 2002. Behavioural adaptation of *Talitrus saltator* populations to beaches with

- different dynamics and degree of human disturbance along Tunisian coasts. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, **47**, 643–650.
- Fanini, L., Cantarino, C.M. & Scapini, F.** 2005. Relationships between the dynamics of two *Talitrus saltator* populations and the impacts of activities linked to tourism. *Oceanologia*, **47**, 93–112.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Fialkowska, E. & Smith, B.D.** 2000. Biomonitoring of trace metals along the Baltic Coast of Poland using the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea: Amphipoda). *Ophelia*, **52**, 183–192.
- Griffiths, C.L., Stenton - Dozey, J.M.E. & Koop, K.** 1983. Kelp wrack and the flow of energy through a sandy beach ecosystem. In: *Sandy beaches as ecosystems* (Ed. by A. McLachlan & T. Erasmus), pp. 547–556, Junk Publ., The Hague.
- Jaramillo, E., Contreras, H. & Quijon, P.** 1996. Macroinfauna and human disturbance in a sandy beach of south-central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, **69**, 655–663.
- Johnson, G.E.L., Attrill, M.J., Sheehan, E.V. & Somerfield, P.J.** 2007. Recovery of meiofauna communities following mudflat disturbance by trampling associated with crab-tiling. *Marine Environmental Research*, **64**, 409–416.
- Ketmaier, V., Scapini, F. & De Matthaeis, E.** 2003. Exploratory analysis of talitrid population genetics as an indicator of the quality of sandy beaches. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **58** (Suppl. 1), 159–167.
- Liddle, M.J.** 1975. A selective review of the ecological effects of human trampling on natural ecosystems. *Biological Conservation*, **7**, 17–36.
- Marsden, I.D. & Rainbow, P.S.** 2004. Does the accumulation of trace metals in Crustaceans affect their ecology – the Amphipods example?. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **300** 373–408.
- Marques, J.C., Gonçalves, S.C., Pardal, M.A., Chelazzi, L., Colombini, I., Fallaci, M., Bouslama, M.F., El Gtari, M., Charfi-Cheikhrouha, F. & Scapini, F.** 2003. Comparison of *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae) biology, dynamics, and secondary production in Atlantic (Portugal) and Mediterranean (Italy and Tunisia) populations. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **58** (Suppl. 1), 127–148.
- Milazzo, M., Chemello, R., Badalamenti, F., Camarda, R. & Riggio, S.** 2002. The impact of human recreational activities in marine protected areas: What lessons should be learnt in the Mediterranean Sea. *Marine Ecology*, **23** (Suppl. 1), 280–290.
- Moffet, M.D., McLachlan, A., Winter, P.E.D. & De Ruyck, A.M.C.** 1998. Impact of trampling on sandy beach macrofauna. *Journal of Coastal Conservation*, **4**, 87–90.
- Moore, P.G. & Rainbow, P.S.** 1987. Copper and zinc in an ecological series of talitroidean Amphipoda (Crustacea). *Oecologia*, **73**, 120–126.

- Morritt, D.** 1988. Osmoregulation in littoral terrestrial talitroidean amphipods (Crustacea) from Britain. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **123**, 77–94.
- Nardi, M., Morgan, E. & Scapini, F.** 2003. Seasonal variation in the freerunning period in two *Talitrus saltator* populations from Italian beaches differing in morphodynamics and human disturbance. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **58** (Suppl. 1), 199–206.
- Palluault, M.** 1954. Notes ecologiques sur le *Talitrus saltator*. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, **91**, 105–129.
- Povey, A. & Keough, M.J.** 1991. Effects of trampling on plant and animal populations on rocky shores. *Oikos*, **61**, 355–368.
- Rainbow, P.S.** 1998. Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans. In: *Metal Metabolism in Aquatic Environment*, (Ed. by W.J. Langston & M.J. Bebianno), Chapman and Hall, London, pp. 285–319.
- Rainbow, P.S. & Moore, P.G.** 1986. Comparative metals analyses in amphipod crustaceans. *Hydrobiologia*, **141**, 273–289.
- Rainbow, P.S., Fialkowski, W. & Smith, B.D.** 1998a. The sandhopper *Talitrus saltator* as a trace metal biomonitor in the Gulf of Gdansk, Poland. *Marine Pollution Bulletin*, **36**, 193–200.
- Rainbow, P.S., Moore, P.G. & Watson, D.** 1998b. Talitrid amphipods (Crustacea) as biomonitors for copper and zinc. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **28**, 567–582.
- Scapini, F., Chelazzi, L., Colombini, I., Fallaci, M. & Fanini, L.** 2005. Orientation of sandhoppers at different points along a dynamic shoreline in southern Tuscany. *Marine Biology*, **147**, 919–926.
- Schlacher, T.A., Dugan, J., Schoeman, D.S., Lastra, M., Jones, A., Scapini, F., McLachlan, A., Defeo, O.** 2007. Sandy beaches at the brink. *Diversity and Distributions*, **13**, 556–560.
- Shepard, F.P.** 1954. Nomenclature based on sand–silt–clay ratios. *Journal of Sedimentary Petrology*, **24**, 151–158.
- Siegel, S. & Castellan Jr. J.N.** 1989. *Non Parametric Statistics for the Behavioral Sciences*, 2nd edition McGraw Hill, New York.
- Ugolini, A. & Macchi, T.** 1988. Learned component in the solar orientation of *Talitrus saltator* Montagu (Amphipoda: Talitridae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **121**, 79–87.
- Ugolini, A. & Scapini, F.** 1988. Orientation of the sandhopper *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae) living on dynamic sandy shores. *Journal of Comparative Physiology*, **162**, 453–462.
- Ugolini, A., Scapini, F., Beugnon, G. & Pardi, L.** 1988. Learning in zonal orientation of sandhoppers. In: *Behavioral Adaptations to Intertidal Life* (Ed. by G. Chelazzi & M. Vannini) pp. 115–118. ASI Series Vol. **151**, Plenum Press, New York.

- Ugolini, A., Felicioni, S., Ruffo, S. & Cipriani, L.** 1995. Distribution of *Talorchestia ugonii* and other sandhoppers in Corsica. *Bollettino di Zoologia*, **62**, 291–296.
- Ugolini, A., Borghini, F., Calosi, P., Bazzicalupo, M., Chelazzi, G. & Focardi, S.** 2004. Mediterranean *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda) as a biomonitor of heavy metals contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 526–532.
- Ugolini, A., Borghini, F., Focardi, S. & Chelazzi, G.** 2005. Heavy metals accumulation in two syntopic sandhopper species: *Talitrus saltator* (Montagu) and *Talorchestia ugonii* (Bellan Santini and Ruffo). *Marine Pollution Bulletin*, **50**, 1328–1334.
- Veloso, V.G., Silva, E.S., Caetano, C.H.S. & Cardoso, R.S.** 2006. Comparison between the macrofauna of urbanized and protected beaches in Rio de Janeiro State, Brazil. *Biological Conservation*, **127**, 510–515.
- Weslawski, J.M., Kupidura, K. & Zabicki, M.** 2000a. Sandhoppers, *Talitrus saltator* (Montagu), at the Polish Baltic coast: seasonal and spatial distribution patterns. *Crustaceana*, **73**, 961–969.
- Weslawski, J.M., Stanek, A., Siewert, A. & Beer, N.** 2000b. The sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) on the Polish Baltic coast. Is it a victim of increased tourism?. *Oceanological Studies*, **29**, 77–87.
- Weslawski, J.M., Urban-Malinga, B., Kotwicki, L., Opalinski, K., Szymelfenig, M. & Dutkowski, M.** 2000c. Sandy coastlines: are there conflicts between recreation and natural values? *Oceanological Studies*, **29**, 5–18.
- Wildish, D.J.** 1988. Ecology and natural history of aquatic Talitroidea. *Canadian Journal of Zoology*, **66**, 2340–2359.
- Zar, J.H.** 1984. *Biostatistical Analysis*, 2nd edition. Prentice-Hall, New Jersey.

CAPITOLO 10

Conclusioni generali

CONCLUSIONI GENERALI

Il sopralitorale di coste sabbiose, un ambiente ecotonale di notevole importanza ecologica, nonostante abbia subito e continui a subire le profonde conseguenze, spesso drammatiche, delle attività antropiche ha ricevuto scarsa attenzione da parte dei ricercatori. Per un corretto funzionamento dell'ecosistema sopralitorale è opportuno considerare tutti quei fattori, legati principalmente all'impatto antropico, che esercitano un'influenza negativa sulle comunità naturali. L'impiego di bioindicatori permette di quantificare, mediante risposte identificabili, gli effetti delle attività umane ai fini sia di una gestione più responsabile sia per una migliore tutela della biodiversità delle zone costiere.

I risultati di questa tesi indicano che l'anfipode talitride *T. saltator* può essere impiegato come bioindicatore dei litorali sabbiosi sia per quel che riguarda gli effetti della frequentazione turistica (Cap. 9) che per quelli riguardanti la contaminazione ambientale (Cap. 2 – 7). Per quel che riguarda l'inquinamento, sia i dati ottenuti applicando un approccio ecotossicologico di tipo classico, basato sulla misurazione dei metalli in traccia nei tessuti degli animali (bioaccumulo) (Cap. 2), che quello ottenuto applicando diversi tipi di biomarkers (Cap. 3 – 7) forniscono dei risultati promettenti. Riguardo il bioaccumulo, i risultati indicano che i talitri possono essere utilizzati con successo per identificare località caratterizzate da un diverso livello di contaminazione da metalli traccia ed, inoltre, impiegati come indicatori della distribuzione spaziale della contaminazione da metalli in traccia anche su scala geografica ridotta. È opportuno sottolineare che la facilità di raccolta e l'economicità dei campionamenti, i quali non richiedono né attrezzature particolari né l'uso di mezzi costosi, rendono l'utilizzo dei talitri come biomonitors particolarmente vantaggioso.

I risultati ottenuti mediante la misurazione di alcuni dei più noti biomarkers come le metallotioneine (Cap. 3) e la variabilità genetica (misurata mediante l'utilizzo di fISSR) (Cap. 4) ne hanno evidenziato la valida applicabilità in *T. saltator*. Inoltre, le risposte comportamentali, sia quelle più semplici (Fototassia, Cap. 5) che quelle più complesse (Orientamento solare Cap. 6 e Attività locomotoria Cap. 7) costituiscono dei promettenti biomarker da esposizione a metalli in traccia. L'orientamento solare di *T. saltator* sembra essere influenzato non soltanto dalla presenza di metalli in traccia, ma anche l'assenza o una diminuzione della concentrazione di Ca^{2+} nel medium acquoso influisce negativamente sulla corretta scelta direzionale dei talitri.

Le risposte comportamentali, essendo chiaramente correlata sia con le risposte ai livelli inferiori di organizzazione biologica (biochimico, fisiologico e cellulare) che con i livelli di popolazione e comunità, consentono una più completa valutazione del rischio ecologico. Per tale motivo, l'applicazione delle risposte comportamentali per valutare lo stato di salute degli ecosistemi

consente di superare i limiti applicativi dell'approccio ecotossicologico basato sui biomarkers.